



Universität zu Köln

**Transport von organischen Säuren
als Vorstufen der
Aminosäurebiosynthese in
Corynebacterium glutamicum
und *Escherichia coli***

**Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades**

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

Vorgelegt von
Tina Radespiel
aus Sindelfingen

Köln, 2010

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. Reinhard Krämer

Institut für Biochemie der Universität zu Köln

2. Gutachter: Frau Prof. Dr. Karin Schnetz

Institut für Genetik der Universität zu Köln

Tag der Disputation: 27.04.2010

“The truth is out there!”

The X-Files

Abstract

The metabolism and transport of branched-chain amino acids have previously been investigated in the best known amino acid producing microorganisms *Corynebacterium glutamicum* and *Escherichia coli*. However, the transport of the precursors is still not resolved.

Both *C. glutamicum* and *E. coli* were found to be sensitive to the α -keto acids. *E. coli* was more sensitive than *C. glutamicum*, for which the active import of α -keto acids could be proven. Additionally BrnQ, a known importer of branched-chain amino acids in *C. glutamicum*, could be excluded as importer of α -keto acids.

The sensitivity of *C. glutamicum* for α -keto acids was used for a search for importers of α -keto acids. Upon screening of a transposon mutant bank no candidate for the import of α -keto acids could be identified. By screening of an insertion mutant bank one candidate for α -ketoisovalerate and α -ketoisocaproate and four candidates for α -ketoisoleucine were identified. A mutant, which was affected in the gene *cgl0146* encoding a transporter of the RhtB-transporterfamily in *C. glutamicum*, showed decreased growth in the presence of α -keto acids and seemed to be involved in their import.

Regarding the export of α -keto acids BrnFE, a known exporter of branched-chain amino acids, could be excluded. The export mechanism of α -ketoisovalerate was determined not to be of the secondary active type. An investigation of 37 insertion mutants lacking (putative) ABC-exporters resulted in the identification of a candidate for an exporter of α -ketoisovalerate. The overexpression of the encoding genes caused an increase of the export of all 3 α -keto acids.

By screening of an *E. coli* gene bank the transporter RhtC could be identified as a putative exporter of α -ketoisocaproate. The heterologous overexpression of *rhtC* in *C. glutamicum* resulted in a slight increase of α -ketoisocaproate-export.

Kurzzusammenfassung

Für die beiden bekanntesten Aminosäureproduzenten *C. glutamicum* und *E. coli* sind die Stoffwechselwege und die Transportwege der verzweigtkettigen Aminosäuren bereits gut untersucht worden. Über den Transport der Vorstufen ist jedoch nichts bekannt.

Sowohl *C. glutamicum* als auch *E. coli* zeigten eine konzentrationsabhängige Sensitivität gegenüber den α -Ketosäuren. *E. coli* war jedoch deutlich sensibler gegenüber den α -Ketosäuren als *C. glutamicum*, für das zusätzlich die Aufnahme der α -Ketosäuren nachgewiesen werden konnte. Außerdem konnte ausgeschlossen werden, dass der bekannte Importer für verzweigtkettige Aminosäuren BrnQ die α -Ketosäuren transportiert.

Die Sensitivität von *C. glutamicum* gegenüber den α -Ketosäuren wurde für die Suche nach Importern für die α -Ketosäuren genutzt. Beim Screening einer Transposonbank von *C. glutamicum* konnten keine Kandidaten für den Import der α -Ketosäuren identifiziert werden. Beim Screening einer Insertionsmutantenbank konnte allerdings jeweils ein Kandidat für α -Ketoisovalerat und α -Ketoisocaproat und 4 Kandidaten für α -Ketoisoleucin identifiziert werden. Eine Mutante, in der das Gen *cgl0146*, das für einen Transporter aus der RhtB-Transporterfamilie in *C. glutamicum* kodiert, betroffen war, zeigte ein deutlich schlechteres Wachstum in Anwesenheit von allen α -Ketosäuren und scheint daher an deren Import beteiligt zu sein.

Bezüglich des Exports der α -Ketosäuren in *C. glutamicum* konnte BrnFE, der bekannte Exporter für verzweigtkettige Aminosäuren, ausgeschlossen werden. Übereinstimmend wurde beobachtet, dass der Exportmechanismus von α -Ketoisovalerat nicht sekundär aktiv ist und die Untersuchung von 37 Insertionsmutanten, denen (putative) ABC-Exporter fehlen, führte zur Identifikation eines Kandidaten für den Export von α -Ketoisovalerat. Die Überexpression der kodierenden Gene *cgl1687-88* bewirkte eine Erhöhung des Exports aller 3 α -Ketosäuren.

Durch das Screening einer *E. coli* Genbank konnte der Transporter RhtC als Exporter für α -Ketoisocaproat identifiziert werden. Die heterologe Expression in *C. glutamicum* führte zu einer leichten Erhöhung des Exports von α -Ketoisocaproat.

1 Inhalt

	Abstract	I
	Kurzzusammenfassung.....	II
1	Inhalt	1
2	Abkürzungsverzeichnis.....	4
3	Einleitung	6
3.1	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	6
3.2	<i>Escherichia coli</i>	7
3.3	Biosynthese der verzweigt-kettigen Aminosäuren in <i>C. glutamicum</i> und <i>E. coli</i>	8
3.4	Transport von Aminosäuren in <i>C. glutamicum</i>	12
3.5	Einfluss der Transmembranflüsse auf die Aminosäureproduktion	14
3.6	Produktion und Anwendung von Aminosäuren und deren Vorstufen.....	15
4	Ziele	18
5	Material und Methoden.....	19
5.1	Oligonukleotide	19
5.2	Verwendete Plasmide und Stämme.....	21
5.2.1	Plasmide	21
5.2.2	Stämme	22
5.3	Antibiotika	26
5.4	Lösungen und Medien	27
5.4.1	Lösungen.....	27
5.4.2	Puffer	29
5.4.3	Komplexmedien	30
5.4.4	Minimalmedien.....	30
5.5	Physiologische Methoden.....	31
5.5.1	Wachstumsversuche mit externer Zugabe von α -Ketosäuren	
	in Mikrotiterplatten	31
5.5.2	Wachstumsversuche mit externer Zugabe von α -Ketosäuren	
	in Schüttelkolben	32
5.5.3	Wachstumsversuche auf Gradientenplatten der α -Ketosäuren	32
5.6	Gentechnische Methoden.....	33

Inhalt

5.6.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> DH5 α Zellen	33
5.6.2	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> DH5 α Zellen	33
5.6.3	Blau-Weiß-Screening.....	34
5.6.4	Herstellung kompetenter <i>C. glutamicum</i> Zellen	34
5.6.5	Elektroporation kompetenter <i>C. glutamicum</i> Zellen	34
5.6.6	Isolation genomischer DNA	35
5.6.7	PCR	35
5.6.8	Agarose-Gelelektrophorese	36
5.6.9	Restriktion von DNA	36
5.6.10	Ligation von DNA.....	36
5.6.11	Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	37
5.6.12	Konstruktion von Insertionsmutanten.....	37
5.6.13	Konstruktion von Überexpressionsmutanten	37
5.6.14	Sequenzierung.....	38
5.7	Biochemische Methoden	38
5.7.1	Importmessungen von ¹⁴ C-markiertem Isoleucin	38
5.7.2	Exportmessung der α -Ketosäuren	39
5.7.3	SDS-Gelelektrophorese (nach Lämmli, 1970)	41
5.7.4	Coomassie-Brilliant-Blau Färbung	41
5.7.5	Western Blot-Analyse	41
5.8	Analytische Methoden	42
5.8.1	HPLC	42
5.9	Bioinformatische Tools	43
6	Ergebnisse	44
6.1	Einfluss von α -Ketosäuren auf das Wachstum von <i>C. glutamicum</i>	44
6.2	Wachstumsinhibition von <i>E. coli</i> durch α -Ketosäuren	54
6.3	Charakterisierung des Imports der α -Ketosäuren in <i>C. glutamicum</i>	55
6.3.1	Untersuchung des Import der α -Ketosäuren über BrnQ	55
6.3.2	Screening nach Importern der α -Ketosäuren durch gerichtete Mutagenese	57
6.3.3	Screening nach Importern der α -Ketosäuren durch ungerichtete Mutagenese	59
6.4	Charakterisierung des Exports der α -Ketosäuren in <i>C. glutamicum</i>	63

Inhalt

6.4.1	Stammhintergründe zur Anreicherung der α -Ketosäuren	63
6.4.2	Untersuchung des Exports von KIV über BrnFE	65
6.4.3	Biochemische Analyse des Exports für KIV in <i>C. glutamicum</i>	66
6.4.4	Untersuchung des Exports der α -Ketosäuren über ein primär	
	aktives Transportsystem	68
6.4.5	Screening nach Exporter für die α -Ketosäuren durch Vergleich mit <i>E. coli</i> ...	74
7	Diskussion	95
7.1	<i>C. glutamicum</i> und <i>E. coli</i> sind sensitiv gegenüber den α -Ketosäuren	
	KIL, KIV und KIC.....	95
7.2	Der Importer BrnQ und der Exporter BrnFE der BCAA sind nicht	
	für den Transport der α -Ketosäuren verantwortlich	97
7.3	Die Sensitivität von <i>C. glutamicum</i> gegenüber den α -Ketosäuren	
	kann zur Suche nach Importern genutzt werden	98
7.4	Das Transportsystem, welches durch die Gene <i>cgl1687-88</i> kodiert	
	wird, ist ein putativer Exporter für die α -Ketosäuren	101
7.5	RhtC aus <i>E. coli</i> ist ein putativer Exporter für KIC in <i>C. glutamicum</i>	103
8	Zusammenfassung	107
9	Referenzen	109
	Danksagung	119
	Erklärung	120
	Lebenslauf	121

2 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung	GRAS	generally
AHAS	Acetohydroxy acid synthase	His	recognized as safe Histidin
AHAIR	Acetohydroxy acid isomeroeductase	Ile IPTG	Isoleucin Isopropyl-b-D-
al.	alumni		thiogalacto-
Ala	Alanin		pyranosid
Asn	Asparagin	KIC	α -Ketoisocaproat
Asp	Aspartat	KIL	α -Ketoisoleucin
BCAA	branched-chain amino acid	KIV Km	α -Ketoisovalerat Kanamycin
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3- Indolylphosphat	Leu Lrp	Leucin leucine responsive
bd.	bidest		protein
bp	base pair	Lsg.	Lösung
BTM	Biotrockenmasse	Lys	Lysin
C	Kohlenstoff	Mrd	Milliarden
ca.	circa	Mrp1	multidrug
C.g.	<i>Corynebacterium</i> <i>glutamicum</i>		resistance related protein 1
cpm	counts per minute	MT	Mikrotiterplatte
Cys	Cystein	N	Stickstoff
Da	Dalton	NBT	p-Nitrotetrazolium-
d. h.	das heißt		blauchlorid
DHAD	Dihydroxy acid synthase	Nx OD	Nalidixinsäure Optische Dichte
E.c.	<i>Escherichia coli</i>	PCR	polymerase chain
Glc	Glukose		reaction
Gln	Glutamin	Phe	Phenylalanin
Glu	Glutamat	Pro	Prolin
Gly	Glycin		

rht	resistant	to	Thr	Threonin
	homoserine	and	Trp	Tryptophan
	threonine		Val	Valin
rpm	rounds per minute		VK	Vorkultur
SDS	sodium-dodecyl		WT	Wildtyp
	sulfate		X-Gal	5-bromo-4-chloro-
Ser	Serin			3-indolyl-D-
Tab.	Tabelle			galactopyranoside

3 Einleitung

Mikroorganismen werden schon seit Jahrtausenden zur Produktion bestimmter Substanzen verwendet, wie z.B. für Ethanol in Bier und Wein oder Milchsäure in Joghurt. Zur biotechnologischen Produktion von Aminosäuren werden die bekanntesten Aminosäureproduzenten *Corynebacterium glutamicum* und *Escherichia coli* jedoch erst seit der Entdeckung von Glutamatproduktion durch *C. glutamicum* eingesetzt [Kinoshita *et al.* 1957]. Diese Entdeckung führte zu ausführlichen Untersuchungen der Stoffwechselwege der Aminosäuren. Der Export wurde dabei jedoch zunächst als unwichtig angesehen und außer Acht gelassen [Marin und Krämer 2007]. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Aminosäuren über spezifische Transportsysteme exportiert wurden [Bröer *et al.* 1991]. Dies zeigte, dass der Transport von Aminosäuren vor allem für die Produktion von zentraler Bedeutung ist, da Deaktivierung von Importern und Überexpression von Exportern zu gesteigerten Erträgen führen konnte. Für die verzweigtkettigen Aminosäuren (BCAA: branched-chain amino acids) Isoleucin (Ile), Valin (Val) und Leucin (Leu) sind die Transporter bekannt. Der Transport der Vorstufen wurde jedoch bisher nicht untersucht.

In der nachfolgenden Einleitung sollen zunächst die bekanntesten Aminosäureproduzenten *C. glutamicum* und *E. coli* vorgestellt werden. Anschließend wird der Stoffwechselweg der BCAA mit Regulation der einzelnen Enzyme sowie der Transport der BCAA näher betrachtet. Desweiteren wird auf die Produktion und Anwendung von Aminosäuren insbesondere der BCAA und deren Vorstufen eingegangen.

3.1 *Corynebacterium glutamicum*

Corynebacterium glutamicum ist ein Gram-positives, aerob-wachsendes apathogenes Bodenbakterium und gehört zu den mycolsäurehaltigen Actinomyceten. Das keulenförmige Bakterium (griech.: coryne = Keule) bildet keine Sporen und ist unbeweglich. *C. glutamicum* wurde von Kinoshita und Mitarbeitern in einem Screeningverfahren für aminosäurebildende Bakterien entdeckt [Kinoshita *et al.* 1957]. Seitdem wird es vor allem für die großtechnische Produktion von L-Glutamat (L-Glu), welches als Geschmacksverstärker verwendet wird, eingesetzt. Aber auch andere Aminosäuren, wie L-Lysin (L-Lys) oder L-Tryptophan (L-Trp), welche als Zusätze in der

Futtermittelindustrie Anwendung finden, werden mit *C. glutamicum* industriell produziert. In kleineren Maßstäben werden auch andere essentielle Aminosäuren wie z.B. die verzweigtkettigen Aminosäuren Val, Ile und Leu hergestellt [Leuchtenberger *et al.* 2005]. Vorteile von *C. glutamicum* als biotechnologischer Produzent im Großmaßstab stellen vor allem die Exkretion der gebildeten Aminosäuren ins Medium und die Klassifikation als GRAS-Organismus („generally recognized as safe“) dar. Eine weitere Bedeutung erhält *C. glutamicum* als molekularbiologischer Modellorganismus auf Grund der nahen Verwandtschaft zu Humanpathogenen wie *Corynebacterium diphtheriae*, *Mycobacterium tuberculosis* und *Mycobacterium leprae* [Stackebrandt *et al.* 1997]. Eine große Unterstützung dieser beiden Anwendungsgebiete von *C. glutamicum* stellte die komplette Sequenzierung des Genoms dar [Kalinowski *et al.* 2003]. Die Produktion der Aminosäuren mit Hilfe von *C. glutamicum* bietet einen deutlichen Vorteil im Vergleich zu *E. coli*. Gram-negative Mikroorganismen wie *E. coli* können auf Grund ihrer O-Antigene auf der Lipopolysaccharidschicht ihrer Zellwand allergieauslösend wirken. Dies ist bei *C. glutamicum* nicht der Fall, was besonders bei medizinischer Anwendung oder bei Nahrungsergänzungsmitteln wichtig ist.

3.2 *Escherichia coli*

Neben *C. glutamicum* wird *Escherichia coli* auch zur großtechnischen Produktion von Aminosäuren wie z.B. L-Lys oder L-Threonin (L-Thr) eingesetzt. *E. coli* wurde 1885 zum ersten Mal von dem Deutschen Kinderarzt T. Escherich beschrieben. Ebenso wie *C. glutamicum* ist es nicht-sporulierend jedoch beweglich durch peritriche Begeißelung. Es ist Gram-negativ, stäbchenförmig und fakultativ anaerob. Ein natürliches Habitat vieler *E. coli*-Stämme ist der Darm von Vertebraten. Jedoch wie bei *C. glutamicum* sind auch in der Gruppe der Enterobakterien (griech.: enteron = „das Innere“, Darm) humanpathogene Vertreter bekannt. Für die biotechnologische Produktion werden jedoch apathogene Stämme verwendet, wobei *E. coli* K-12 den bekanntesten Vertreter darstellt. Vor allem die Sequenzierung des gesamten Genoms von *E. coli* K-12 bereits 1997 [Blattner *et al.* 1997] und das äußerst schnelle Wachstum machten dieses Bakterium zum bestuntersuchten Modellorganismus der Molekularbiologie.

3.3 Biosynthese der verzweigtkettige Aminosäuren in *C. glutamicum* und *E. coli*

Aminosäuren werden aus Zwischenprodukten des Zentralstoffwechsels gebildet und können bezüglich der Abzweigung vom Zentralstoffwechsel in unterschiedliche Gruppen eingeteilt werden. Alanin (Ala), Val, Leu und Ile werden z. B. von Pyruvat aus gebildet, während Thr und Lys zur Aspartatgruppe gezählt werden, welches sich vom Oxalacetat ableitet. Die Einteilung der Aminosäuren in Gruppen ist in Abb. 3.3.1 ausgehend vom Zentralstoffwechsel dargestellt.

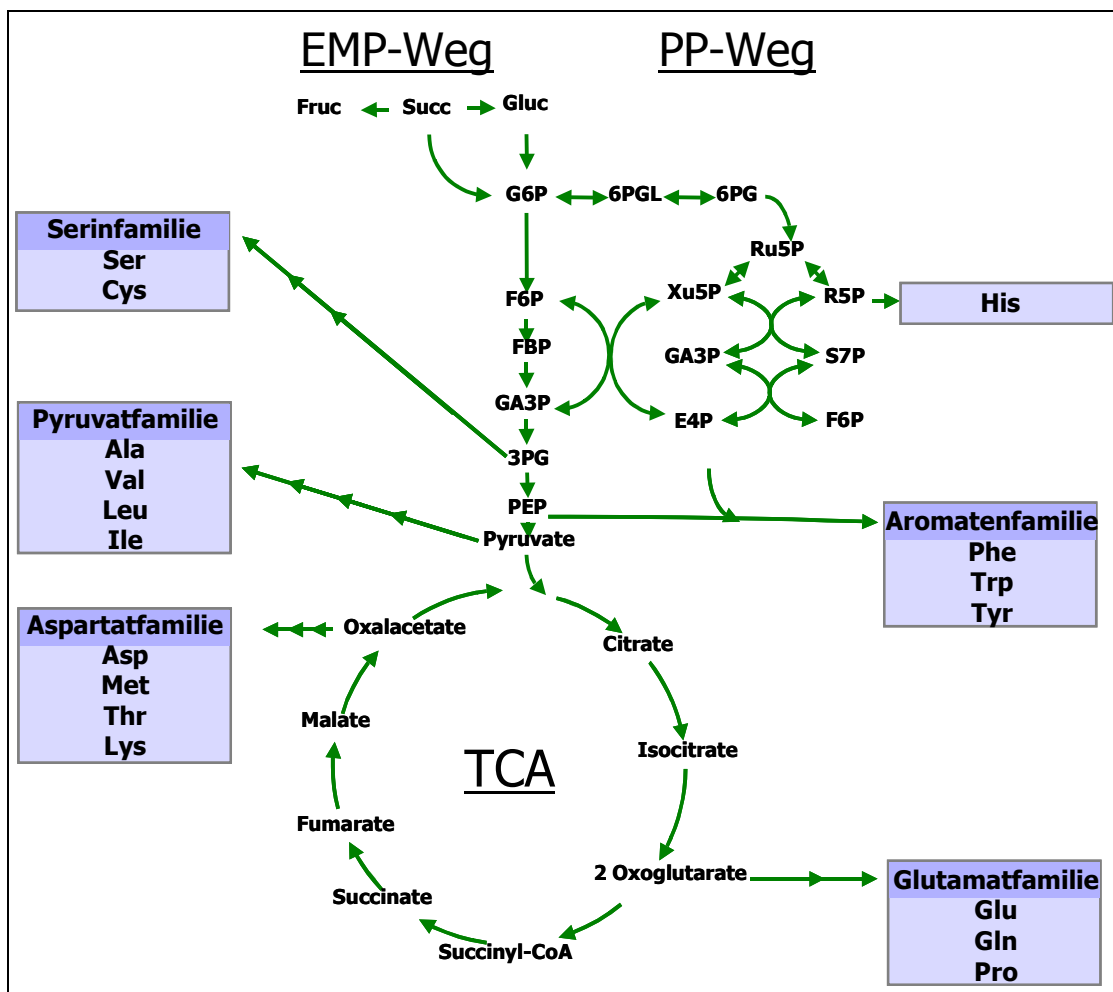


Abb. 3.3.1: Einteilung der gebildeten Aminosäuren auf Grund des Ausgangsstoffes des Zentralstoffwechselweges [Kay Marin, Vorlesung]

Wie die meisten Stoffwechselwege unterliegt auch der Metabolismus der Aminosäuren unterschiedlichen Regulationsmechanismen, um die notwendige Konzentration der Aminosäuren in der Zelle zu erhalten. Hauptsächlich werden Aminosäuren für den

Einleitung

Aufbau von Proteinen verwendet. Sie können jedoch auch wieder in der Zentralstoffwechsel eingespeist und als C- oder N-Quelle weiter verstoffwechselt werden.

In Abb. 3.3.2 ist der Syntheseweg für die BCAA in *C. glutamicum* dargestellt.

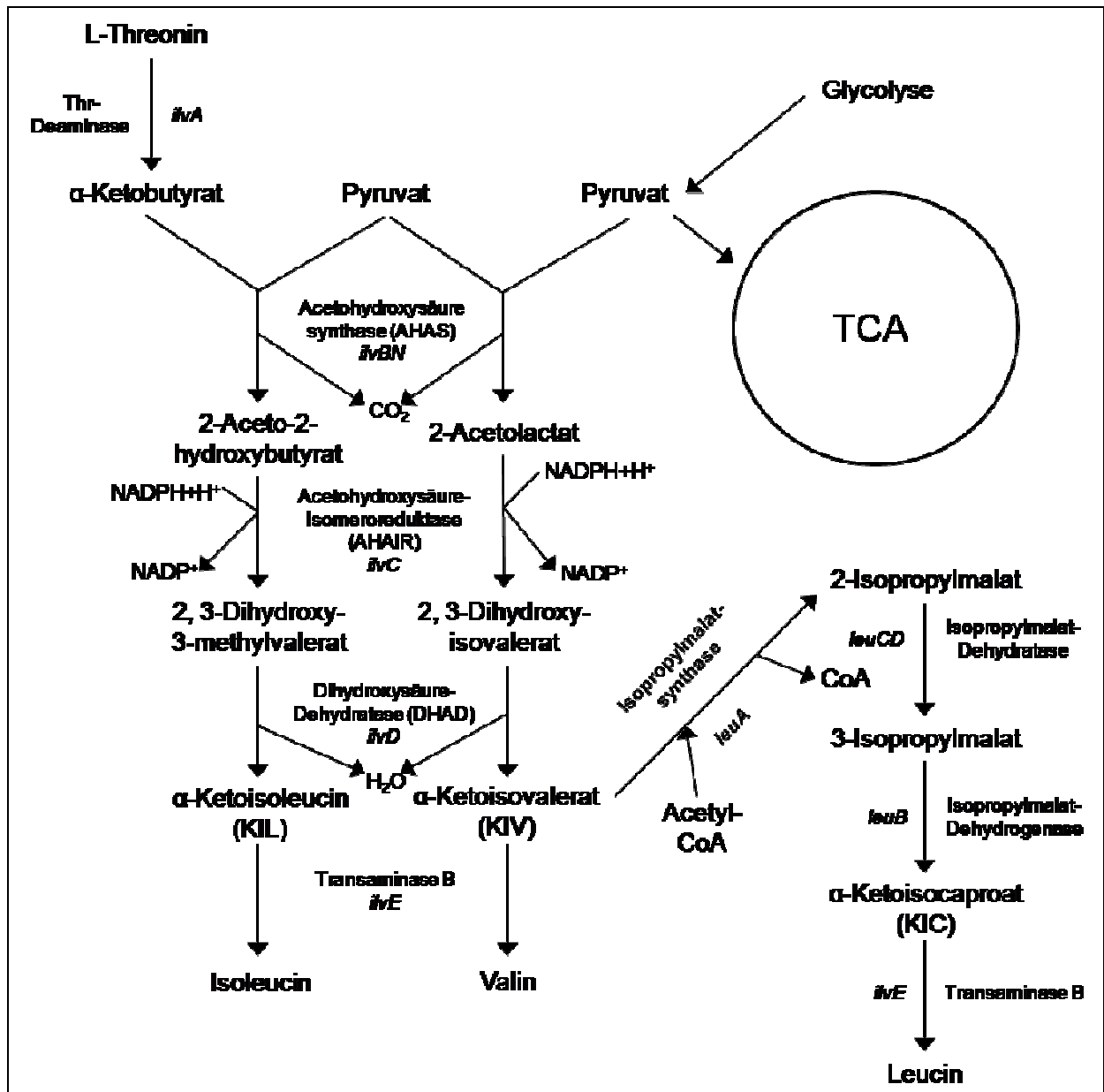


Abb.3.3.2: Biosynthese der verzweigtkettigen Aminosäuren Ile, Val und Leu in *C. glutamicum* ausgehend vom Pyruvat (Glycolyse) und α -Ketobutyrat (Threonin-Stoffwechsel), basierend auf [Umbarger 1996]. (AHAS: Acetohydroxy acid synthase; AHAIR: Acetohydroxy acid isomeroreductase; DHAD: Dihydroxy acid dehydratase)

Einleitung

Der Syntheseweg der BCAA in *E. coli* unterscheidet sich durch die Anwesenheit von drei Isoenzymen der AHAS (I-III). Die Ausgangssubstrate für die BCAA sind Pyruvat, welches im Zentralstoffwechsel gebildet wird, und α -Ketobutyrat, das durch die Thr-Deaminase aus Thr gebildet wird. Für die Bildung von Isoleucin werden zunächst α -Ketobutyrat und Pyruvat unter Abspaltung von CO_2 zu 2-Aceto-2-hydroxybutyrat verbunden. Dies wird durch die Acetohydroxysäuresynthase (AHAS: acetohydroxy acid synthase; *ilvBN*) katalysiert. Daraus wird dann 2, 3-Dihydroxy-3-methylvalerat unter Verwendung von $\text{NADPH} + \text{H}^+$ mittels der Acetohydroxysäureisomero-reduktase (AHAIR: acetohydroxy acid isomero-reductase; *ilvC*) gebildet. Die Dihydroxysäure-Dehydratase (DHAD: dihydroxy acid dehydratase; *ilvD*) wandelt 2, 3-Dihydroxy-3-methylvalerat unter Abspaltung von H_2O in α -Ketoisoleucin um. Die Transaminase B (*ilvE*) überträgt schließlich eine Aminogruppe auf die α -Ketosäure. An der Bildung von Valin sind dieselben Enzyme beteiligt. Allerdings stellen 2 Moleküle Pyruvat die Ausgangssubstrate dar. Diese werden in 2-Acetylactat, in 2,3-Dihydroxyisovalerat und schließlich in α -Ketoisovalerat umgewandelt. Zum Schluss überträgt wieder die Transaminase B eine Aminogruppe auf die α -Ketosäure. Leucin wird ausgehend von KIV gebildet. Die Isopropylmalatsynthase (*leuA*) bildet aus KIV und Acetyl-CoA 2-Isopropylmalat, welches durch die Isopropylmalat-Dehydratase (*leuCD*) in 3-Isopropylmalat umgewandelt wird. Die Isopropylmalat-Dehydrogenase (*leuB*) katalysiert die Umwandlung von 3-Isopropylmalat in α -Ketoisocaproat, auf das die Transaminase B eine Aminogruppe überträgt.

Die Synthese der BCAA wird wie andere Stoffwechselwege durch unterschiedliche Regulationsmechanismen kontrolliert. Dabei bildet die AHAS das Schlüsselenzym des Stoffwechsels der BCAA [Elišáková *et al.* 2005]. In *C. glutamicum* gibt es eine AHAS [Eggeling *et al.* 1987], die von den Genen *ilvB* und *ilvN* kodiert wird. Diese Gene bilden ein Operon mit *ilvC* [Keilhauer *et al.* 1993]. Bereits die Expression der Gene *ilvBNC* wird durch die BCAA reguliert [Morbach *et al.* 2000]. Bei limitiertem Wachstum durch Mangel einer der BCAA wird die Aktivität des *ilvB*-Promotors verdoppelt, zusätzlich führt eine erhöhte Konzentration an α -Ketobutyrat zu einer Induktion des Operons [Keilhauer *et al.* 1993]. Auch die Aktivität der AHAS wird durch die Anwesenheit der BCAA beeinflusst. Durch Vorhandensein einer der BCAA wird die Aktivität der AHAS auf ca. 50% reduziert [Leyval *et al.* 2003]. Jedoch selbst in Anwesenheit aller drei BCAA, kann die Reduktion der Aktivität nicht 57% übersteigen [Eggeling *et al.* 1987]. Die AHAS wird aus zwei

Einleitung

kleinen regulatorischen (IlvN) und zwei großen katalytischen Untereinheiten (IlvB) gebildet. [Pátek 2007]. Auf die Thr-Deaminase wirken Ile und Leu inhibierend, während Val dieses Enzym aktiviert [Pátek 2007]. In *C. glutamicum* wird die AHAS durch Val und Leu inhibiert [Pátek 2007]. Die DHAD wird nur geringfügig durch Val und Leu inhibiert. Die Isopropylmalat-Synthase (LeuA), das erste Enzym im Leucin Stoffwechselweg ausgehend von KIV, wird durch Leucin inhibiert. Die Expression von *leuB* wird ebenfalls durch Leu unterdrückt. Die Transaminierung der α -Ketosäuren wird in *C. glutamicum* hauptsächlich von IlvE katalysiert [Leyval *et al.* 2003]. Jedoch auch AvtA katalysiert die Transaminierung von KIV und geringfügig von KIL [Marienhagen *et al.* 2005].

In *E. coli* dagegen wurden drei Isoenzyme, AHAS I (*ilvBN*), AHAS II (*ilvGM*) und AHAS III (*ilvIH*) identifiziert, die sich auf Grund ihrer Affinität zu den Ausgangssubstraten aber auch bezüglich ihrer Inhibition durch die BCAA unterscheiden [Umbarger 1996]. Die großen Untereinheiten der AHAS I-III weisen eine Identität von 45% zu der großen Untereinheiten der AHAS aus *C. glutamicum* auf. Die kleine Untereinheit IlvH (AHAS III) ist zu 39% und IlvN (AHAS I) zu 30% identisch zu IlvN aus *C. glutamicum* [Pátek 2007]. Die Expression der AHAS II-Gene (*ilvGMEDA*-Operon) wird durch alle drei BCAA reguliert. Bei *ilvBN* ist dies jedoch nur durch Val und Leu der Fall. Die Expression der *ilvBN*-Gene wird dagegen durch den Transkriptionsfaktor Lrp (leucine-responsive protein) kontrolliert [Wang *et al.* 1993]. Die Expression von *ilvIH* wird nur durch Leu unterdrückt [Umbarger 1996]. Die BCAA beeinflussen die AHAS allerdings auch direkt in ihrer Aktivität. Für die Inhibition ist jeweils die kleine Untereinheit (*ilvN*, *ilvM* oder *ilvH*) zuständig, während die große Untereinheit die Enzymaktivität übernimmt [Umbarger 1996]. Valin hemmt z.B. die AHAS I und III, wohingegen die AHAS II dagegen immun ist. Die AHAS III wird zusätzlich noch durch Ile und Leu gehemmt. In *E. coli* K-12 werden jedoch nur die Gene für AHAS I und AHAS III exprimiert, wodurch *E. coli* K-12 sensitiv auf erhöhte Val-Konzentrationen reagiert [Lawther *et al.* 1981]. Bezogen auf die Ausgangssubstrate, verhalten sich die AHAS II und III aus *E. coli* und ebenso aus *S. enterica* serovar *Typhimurium* [Umbarger 1996] vergleichbar zur AHAS aus *C. glutamicum*. Alle drei AHAS-Isoenzyme besitzen eine höhere Affinität zu α -Ketobutyrat als zu Pyruvat, was zu einer bevorzugten Synthese von Ile in Anwesenheit von α -Ketobutyrat und dementsprechend zu einem Mangel an Val und Leu führen kann [Eggeling *et al.* 1987]. In *C. glutamicum* liegen die Affinitätskonstanten für α -Ketobutyrat

bei $K_M = 3,8 \cdot 10^{-3}$ M mit V_{\max} von 0,58 U/mg und für Pyruvat ist $K_M = 8,4 \cdot 10^{-3}$ M mit V_{\max} von 0,37 U/mg [Eggeling *et al.* 1986]. Ebenso wie in *C. glutamicum* wirken in *E. coli* Ile und Leu inhibierend auf die Thr-Deaminase, während Val dieses Enzym aktiviert [Pátek 2007]. Das *leuABCD*-Operon wird auf Transkriptionsebene durch Leu abgeschwächt [Wessler and Calvo 1981]. Die Umwandlung von KIC in Leucin wird in *E. coli* nicht nur durch IlvE sondern auch durch die Leucin Aminotransferase (TyrB) katalysiert, die durch Leucin und KIV inhibiert wird [web 2]. Für Val ist dies auch der Fall durch AvtA [Umbarger 1996].

In *C. glutamicum* ist über die regulatorische Wirkung der α -Ketosäuren auf den Stoffwechselweg der BCAA noch nichts bekannt.

3.4 Transport von Aminosäuren in *C. glutamicum*

Für das Überleben einer Zelle ist der Austausch von Substanzen mit ihrer Umgebung notwendig. Für das Wachstum notwendige Substrate müssen aufgenommen und toxische Abfallprodukte an die Umgebung abgegeben werden können. Die hydrophobe Zellmembran ist jedoch hauptsächlich für kleine Moleküle wie H_2O und O_2 oder für hydrophobe Substanzen durchlässig. Anderen Substanzen müssen daher meistens mit Hilfe von Transportsystemen durch die Zellmembran geschleust werden.

Für den Transport von Aminosäuren oder auch α -Ketosäuren durch die Zellmembran gibt es prinzipiell 3 verschiedene Möglichkeiten:

- Diffusion
- ATP-abhängiger Transport über primär aktive Transporter
- Sekundär aktiver Transport in Symport oder Antiport mit Ionen/Substraten

Die Diffusion ist ein passiver Transport durch die Zellmembran, da sie immer entlang des elektrochemischen Konzentrationsgradienten verläuft. Für Ile konnte neben Import- und Exportsystemen auch eine geringe Diffusion durch die Zellmembran nachgewiesen werden [Zittrich *et al.* 1994]. Beim aktiven Transport ist eine Energiequelle notwendig, da dabei gegen den Konzentrationsgradienten transportiert wird. Primär aktive Transporter nutzen dabei die Hydrolyse von ATP. Dafür besitzen die sogenannten ABC-Transporter (ATP-binding-cassette) eine spezifische Bindestelle. Sekundär aktive Transporter beziehen dagegen ihre Energie aus dem elektrochemischen Gradienten

des Cosubstrates. Das Substrat und das Cosubstrat können entweder in eine gemeinsame Richtung (Symport) oder in die entgegengesetzte Richtung (Antiport) transportiert werden.

Von den > 2900 proteinkodierenden Genen in *C. glutamicum* besitzen ca. 400 Proteine mindestens zwei oder mehr Transmembrandomänen (TMD) und können daher als mögliche Transporter angesehen werden. Davon werden ca. 130 zu den sekundär aktiven Transportern gezählt. In *C. glutamicum* gehören fast alle bis jetzt identifizierten Transporter für Aminosäuren in die Klasse der sekundär aktiven Transporter [Marin und Krämer 2007]. Für den Import von Glu wurde jedoch auch ein primär-aktiver ABC-Transporter (GluABCD) gefunden [Kronemeyer *et al.* 1995]. Der mechanosensitive Kanal YggB wird mit dem Export von Glu in Verbindung gebracht [Nakamura *et al.* 2007]. In *C. glutamicum* gibt es für einige Aminosäuren sowohl Import- als auch Exportsysteme. Im ersten Hinblick erscheint dies als eine Energieverschwendung für die Zelle, da ein „futile cycle“ entsteht. Je nach Umweltbedingung besteht aber die Notwendigkeit für beide Transportwege. Bei Aminosäuren oder Peptiden in der Umgebung müssen aufgenommene Aminosäuren von der Zelle nicht mehr selbst produziert werden und führen daher zu einer Energieersparnis. Des Weiteren können Aminosäuren auch als C- oder N-Quelle dienen. Daher sind Aufnahmesysteme für Aminosäuren für die Zelle von Vorteil [Burkovski *et al.* 2002]. Auch der Export von Aminosäuren ist für die Zelle unter bestimmten Bedingungen vorteilhaft. Bei Wachstum auf Peptiden kann es ohne ein geeignetes Exportsystem zu Akkumulation einzelner Aminosäuren, welche ein häufiger Bestandteil von Peptiden sind, kommen, da einige Aminosäuren langsamer oder nicht weiter verstoffwechselt werden können. Es wurde gezeigt, dass das Wachstum von *C. glutamicum* auf Glukose und einer geringen Menge des Dipeptids Lys-Ala, bei gleichzeitiger Deletion des Lys-Exporters LysE, zu einer Anreicherung von 1M Lys intrazellulär und dadurch zu einer Wachstumsinhibition führte [Vrljic *et al.* 1996, Bellmann *et al.* 2001]. Neben einem eingeschränkten Katabolismus, wie bei Lys, kann auch ein „overflow“ Metabolismus, wie bei Glu, oder ein deregulierter Anabolismus zur Exkretion von Aminosäuren führen [Burkovski *et al.* 2002].

H. Ebbighausen zeigte, dass in *C. glutamicum* alle verzweigtkettige Aminosäuren über einen gemeinsamen Transporter in die Zelle aufgenommen werden [Ebbighausen *et al.* 1989]. Dies wurde auch schon bei anderen Gram-positiven Bakterien, wie *Streptococcus cremoris* [Driessen *et al.* 1987], beobachtet. Der Importer wurde als Na⁺-

Symporter identifiziert und besitzt 12 TMD sowie unterschiedliche Affinitäten zu Ile, Leu und Val. Für Ile wurde eine Aufnahmerate von ca. 1 nmol/min*mg BTM ermittelt. Er wurde BrnQ benannt, wird von *cgl2310* kodiert [Tauch *et al.* 1998] und gehört zur LIVCS Familie. BrnQ wird durch die Anwesenheit von Ile induziert und die Regulation basiert auf der Neusynthese des Transporters und nicht auf dem Einfluss auf die Aktivität [Boles *et al.* 1993].

Der Exporter für die verzweigtkettigen Aminosäuren besteht aus 2 Untereinheiten mit 5-8 bzw. 3-4 TMD und transportiert im H⁺-Antiport. Er gehört zur LIV –E Familie [Kennerknecht *et al.* 2002] und wird von *cgl0258* und *cgl0259* kodiert. Auch BrnFE weist eine unterschiedliche Affinität zu den BCAA auf. Ile und Leu werden mit $V_{\max} = 7$ nmol/min*mg BTM exkretiert. Für Val liegt jedoch eine deutlich niedrigere Exportrate von 3 nmol/ min*mg BTM vor [Kennerknecht *et al.* 2002]. Neben den verzweigtkettigen Aminosäuren exportiert BrnFE auch Methionin [Trötschel *et al.* 2005]. Es wurde festgestellt, dass eine Überexpression von *ygaZH* in *E. coli* (Homolog zu *brnFE* in *C. glutamicum*), welches einen L-Val-Exporter in *E. coli* kodiert, zu einer Erhöhung des L-Val-Exports führte [Park *et al.* 2007]. Eine Deletion von *ygaZH* hatte jedoch keinen Einfluss auf den L-Val –Export. Dies deutet darauf hin, dass in *E. coli* noch weitere L-Val-Exporter existieren. Für die Suche nach weiteren Exportern der verzweigtkettigen Aminosäuren in *C. glutamicum* und für Vergleichsstudien sollten diese Ergebnisse berücksichtigt werden.

In wie weit die α -Ketosäuren in *C. glutamicum* überhaupt importiert oder exportiert werden und ob der Importer der BCAA, BrnQ, und der Exporter, BrnFE, daran beteiligt sind, war zu Beginn der Arbeit noch nicht bekannt.

3.5 Einfluss der Transmembranflüsse auf die Aminosäureproduktion

Um die industrielle Produktion und vor allem die Ausbeuten an Aminosäuren zu erhöhen gibt es mehrere Möglichkeiten. Neben der Optimierung von Fermentationsparametern wurde vor allem in den letzten Jahren das „Metabolic Engineering“ vorangetrieben. Dabei wird die Überproduktion von Stoffwechselprodukten oder das Ausschalten von Engpässen in Stoffwechselwegen mit Hilfe von gezielten gentechnischen Methoden erreicht [Park *et al.* 2007]. In *C. glutamicum* Stämmen, die für die industrielle Produktion der verzweigtkettigen Aminosäuren verwendet werden, wurde z.B. eine Untereinheit der PDH (Pyruvatdehydrogenase, *aceE*) ausgeschaltet, damit Pyruvat in die Aminosäuren

umgewandelt und nicht in den TCA-Zyklus eingespeist wird [Blombach *et al.* 2007]. Allerdings werden die Stämme dadurch Acetat auxotroph.

Auch der Transport von Aminosäuren spielt eine wichtige Rolle, da durch Export die gewünschten Produkte aus dem intrazellulären Gleichgewicht entfernt und nachproduziert werden. Zusätzlich können exkretierte Produkte leichter von den Zellen getrennt werden. Außerdem könnte ein Stoffwechselprodukt, welches durch Überproduktion in höheren Konzentrationen vorliegt, regulativ für die Zelle wirken, wenn es nicht exportiert werden kann. Der Import des gewünschten Produkts ist ebenso nicht zu vernachlässigen, da durch diesen „futile cycle“ entstehen, welche eine Minimierung der Erträge darstellen und die Ausbeute verringern können. Für viele proteinogenen Aminosäuren sind die zugehörigen Import- und Exportsysteme in *C. glutamicum* jedoch noch nicht bekannt, wie z.B. für Gln [Marin und Krämer 2007].

Der Transport der α -Ketosäuren ist vor allem für die industrielle Produktion der verzweigtkettigen Aminosäuren von Interesse. Bei Export der α -Ketosäuren würde die Ausbeute verringert werden, da die α -Ketosäuren nicht mehr in die Aminosäuren umgewandelt werden würden.

3.6 Produktion und Anwendung von Aminosäuren und deren Vorstufen

Neben der biotechnologischen Produktion können Aminosäuren auch durch saure Hydrolyse von tierischen Proteinen, enzymatische Katalyse von Vorstufen oder chemische Synthese hergestellt werden. 2004 wurde der Weltmarkt für Aminosäuren auf ca. 4,5 Mrd US \$ geschätzt, wobei die fermentative Herstellung ca. 80 % einnahm [Marz 2005, Abb. 3.6.1a]. L-Glu wird in Form von Mononatrium-Glutamat als Geschmacksverstärker in der Lebensmittelindustrie eingesetzt. L-Lys, L-Thr und L-Trp finden Anwendung als Futtermittelzusätze, vor allem in der Schweine- und Geflügelzucht, und beanspruchten ca. 56 % des Weltmarktes im Jahre 2004. L-Aspartat (L-Asp) und L-Phenylalanin (L-Phe) bilden die Vorstufen des künstlichen Süßstoffes Aspartam. Die übrigen proteinogenen Aminosäuren werden in der pharmazeutischen und kosmetischen Industrie eingesetzt, zusätzlich bilden sie das Rohmaterial für die Synthese von enantiomer reinen Substanzen [Leuchtenberger *et al.* 2005]. Im Bereich

Einleitung

der Synthese von Produkten aus Aminosäuren wird das durchschnittliche jährliche Wachstum auf ca. 7 % geschätzt [Brown 2005, Abb. 3.6.1B].

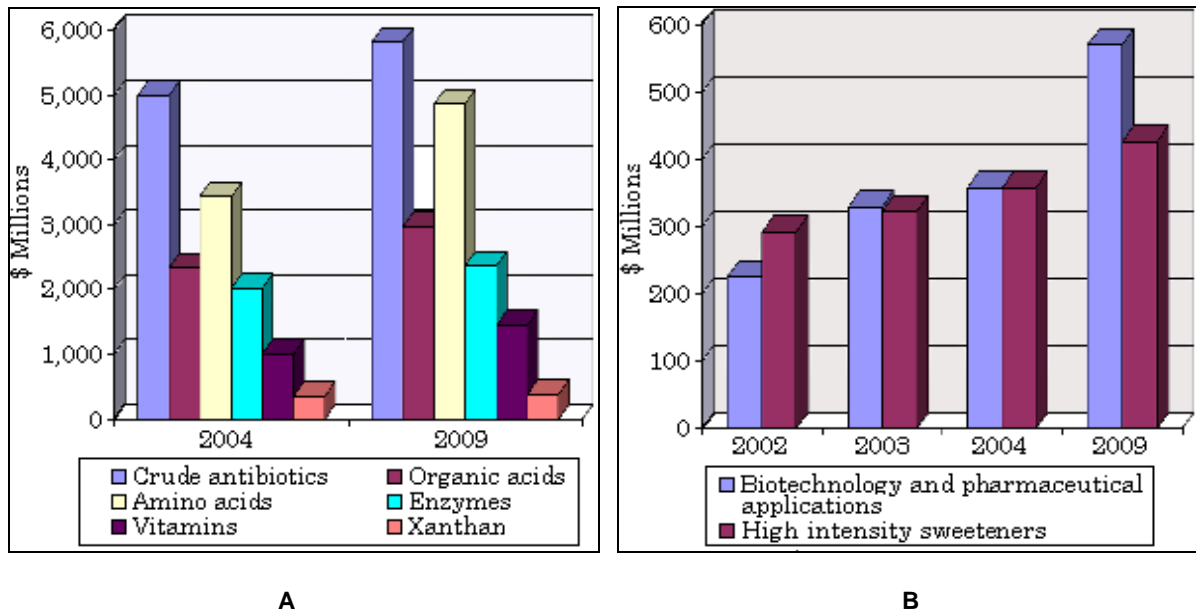


Abb. 3.6.1: A) Darstellung des Weltmarkts für Fermentationsprodukte im Jahre 2004 und eine Prognose des Weltmarkts für 2009 [Marz 2005]
B) Darstellung des Weltmarkt für Produkte synthetisiert aus Aminosäuren in den Jahren 2002-2004 und eine Prognose des Weltmarkts für 2009 [Brown 2005]

Alle drei verzweigtkettigen Aminosäuren sind für Menschen essentiell und können deshalb als Nahrungsergänzungsmittel eingesetzt werden. Die BCAA fördern das Muskelwachstum indem sie die Ausschüttung von Insulin und dem Wachstumshormon STH erhöhen. Leucin und seine Vorstufe α -Ketoisocaproat verhindern den Abbau von Muskelproteinen nach körperlicher Anstrengung [web1]. Die zusätzliche Zufuhr von BCAA soll möglicherweise die Muskelzerstörung nach Ausdauerbelastung vermindern [Coombes and McNaughton 2000]. In der Medizin finden sie Verwendung als Zusätze in Infusionslösungen.

Neben den BCAA können auch die α -Ketosäuren α -Ketoisoleucin (KIL), α -Ketoisovalerat (KIV) und α -Ketoisocaproat (KIC) (im Folgenden als α -Ketosäuren bezeichnet) als Nahrungsergänzungsmittel eingesetzt werden. Bei Krankheiten mit Anreicherung von Stickstoff im Körper, können die α -Ketosäuren als diätische Zusätze für eine Abnahme dieser stickstoffreichen Substanzen sorgen [Hutson *et al.* 1981]. Eine therapeutische Wirkung auf den Proteinmetabolismus von Patienten mit chronischem Nierenversagen, angeborener Hyperammonämie oder Muskeldystrophie wurde bereits beschrieben [Walser *et al.* 1990]. Eine weitere Anwendung besteht in der Umwandlung

der α -Ketosäuren in verzweigt-kettige Alkohole, die als Biotreibstoff eingesetzt werden können [Atsumi *et al.* 2008]. Dafür wurden in einem *E. coli*-Stamm, der die α -Ketosäuren in erhöhtem Maße produzierte, das Enzym 2-Ketosäure-Decarboxylase und das Enzym Alkoholdehydrogenase überexprimiert. Durch weitere Veränderungen im Stoffwechsel der α -Ketosäuren konnte die Ausbeute der Umwandlung von KIV in Isobutanol bezogen auf die eingesetzte Glukosemenge auf 86% gesteigert werden [Atsumi *et al.* 2008].

4 Ziele

Über den Import und den Export der α -Ketosäuren KIL, KIV und KIC ist in bakteriellen Zellen bisher noch nichts bekannt.

Zunächst sollte untersucht werden, ob *C. glutamicum* die α -Ketosäuren aufnimmt. Anschließend sollte als erster Kandidat für den Import der α -Ketosäuren BrnQ untersucht werden. Sollte der Import nicht über BrnQ erfolgen muss ein systematisches Screening in der arbeitsgruppeninternen Mutantenbank durchgeführt werden. Eine weitere Möglichkeit für die Suche nach Importern bot das Screening einer Transposonbank (AG Kalinowski, Uni Bielefeld) von *C. glutamicum*. Durch Vorversuche sollte jedoch erst ermittelt werden, wie dieses Screening weitest gehend automatisiert durchgeführt werden konnte

Um den Export der α -Ketosäuren zu untersuchen, mussten zuerst einige Modifikationen des Metabolismus durchgeführt werden, wodurch eine Anreicherung der α -Ketosäuren erreicht werden konnte. Diese Veränderungen im Stoffwechsel der BCAA wurden hauptsächlich von der Arbeitsgruppe von B. Eikmanns (Uni Ulm) durchgeführt. Nach der Etablierung eines geeigneten Testsystems für den Export der α -Ketosäuren sollte untersucht werden, ob der Export über BrnFE vermittelt wird. Sollte der Export der α -Ketosäuren nicht über BrnFE stattfinden, sollte durch Bestimmung des Exportmechanismus die Anzahl an zu untersuchenden Mutanten eingegrenzt werden. Bei putativem primär aktivem Export würde das Screening einer Mutantenbank mit 37 inaktivierten putativen ABC-Exportern folgen. Bei putativem sekundär aktivem Export sollte die bereits beim Import verwendete Arbeitsgruppen-interne Mutantenbank herangezogen werden, da in dieser Mutantenbank hauptsächlich putative sekundär aktive Transporter deaktiviert worden waren. Eine andere Möglichkeit für das Screening nach Exportern stellte ein Vergleich zu *E. coli* dar. Dafür musste jedoch erst der Einfluss der α -Ketosäuren auf das Wachstum von *E. coli* untersucht werden. Sollte *E. coli* dabei einen schlechter wachsenden Phänotyp aufweisen, sollten damit Mutanten untersucht werden, die zuvor mit einer *E. coli*-Genbank [Novak 1995] transformiert worden waren. Die identifizierten putativen Exporter für die α -Ketosäuren in *E. coli* sollten zu Vergleichsstudien mit *C. glutamicum* herangezogen werden, um putative Exporter in *C. glutamicum* zu identifizieren. Anschließend sollte auch die heterologe Expression des *E.*

coli Exporters in *C. glutamicum* und die Untersuchung des Einflusses auf den Export der α -Ketosäuren durchgeführt werden.

5 Material und Methoden

5.1 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) erworben.

Tab. 5.1.1: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide mit Bezeichnung und Angabe der Sequenz

Name	Sequenz
pZ8-1 5'	GAGAGCGTTCACCGACAA
pZ8-1 3'	CGCCGACATCATAACGGT
pZ8-1brnFE fragment 3'	GGCGCTGCTGATCTTCTT
pZ8-1brnFE fragment 5'	TCAGGATGGCCTTCTGCT
cgl0632 5'	CTTGTGGTCACGGTGTCT
cgl0632 3'	ACTGAACACTGCCGGTAA
cgl0632 5' K	GTTCCGCAGCATTGTTGA
cgl1952 5'	TGGGTGACCATCAAACCTC
cgl1952 3'	AGTTTGCCCAAGCCAAGG
cgl1952 5' K	CGCACTTGAGCGCATGTA
cgl2310 5'	CTTCGGAGCTGGAAACCT
cgl2310 3'	TGCCATCAGCGAACTCAC
cgl2310 5' K	ACCTGCGCTCGTCTTAAT
cgl2781 5'	ATCATGCGCCGGAAGATT
cgl2781 3'	AGCAATCGAGGCAATACC
cgl2781 5' K	CCGGCCGAATGTAACCTGA
cgl3083 5'	GCGGAATCGGTGAGACTT
cgl3083 3'	CCACCGCGAATAATGGCA
cgl3083 5' K	ACGTGATGCGTCGACAAG
M13 rev	AACAGCTATGACCATG
M13 fwd	GTTTTCCAGTCACGAC
M13 FP	TGTAAAACGACGGCCAGT
M13 RP	CAGGAAACAGCTATGACC
pVWex1 5'	CATCGGAAGCTGTGGTATGG
pVWex1 3'	ACACTACCATCGGCGCTACG
cgl 0146 5' mitte	TGACAGCCACGGCTGCATCT
cgl 2574 5' mitte	GGCACGTACCTAAGCTTCAT

Material und Methoden

cgl 2941 5' mitte	GCCGGAGCAACTGCATTATT
pEKex2 fwd	ATCGGCTCGTATAATGTG
pEKex2 rev	CCGCTTCTGCGTTCTGATT
BamHI Rbs rhtC 5'	ATTAATGGATCCAGGAGACACCACCACCACCACG CACTGTTGATGTTATTTCTCACCGTCGCCATGGTGCACA TTGTGG
rhtC EcoRI 3'	CGGAATTCCTCACCGCGAAATAATCAAATGAATGCC
rhtC His EcoRI 3'	GGATTGGCATTCAATTTGATTATTTGCGGGTGAGGTG AATTGTATCA
BamHI Ala Leu Promotor cgl1687	GCACTAGGATCCTGCTAGGTGCTGCGATACCTACGAA AACACATGTCAAAGCTGCA
BamHI Rbs Ala Leu cgl1687 5'	GCACTAGGATCCAGGAGAGCACTAATGCTTTCAATTT GCGCAAAAATTGGATATTCGACGACAATTGCAGAA
cgl1688 Ala Leu Strep KpnI	TAGTGCGGTACCTAGTGCTTACTTTTCGAAGTGGGGT GGGACCATAGTGCTTCATTTAGTAGGGAAACAATAATAA TTGACACTACTACAGTCGGTA
cgl1688_2	CTGTTGGCTGTTGTCTTAGG
Prom2	CACACCGAGCGTAGTAAGAA
ilvBNC 1	AATACGCATGGCCAGTCG
ilvBNC 1b	ATCGAGTTCACCGAGGAT
ilvBNC 2	CATCCGCGTCGGAACAAT
ilvBNC 2b	AACGCGAGCTGGTTCTTA
ilvBNC 3	ATATCCGCGGCATCACCA
ilvBNC 3b	TAACGGCCTTCCAAGTCG
ilvBNC 4	CGACCTGCTGATTGCTAT
ilvBNC 4b	TCTGCATTGCAACCTCTG
ilvBNC 5	GACCAACCAGGAACCTCAC
ilvBNC 5b	ACTGTGTCCGCTGTTGGT
ilvBNC 5 c	CTGCCATTGGCGAACCAT
ilvBNC 6	CGAGGCATAAGGAGAGAC
ilvBNC 7	GCTCCGGCCAAGATCTAA
ilvBNC 8	CACGGCCTGAACATTCAC
ilvBNC 9	ACATCCTGACCGATATCC
ilvBNC 9 c	TTGAAGCCGAGACCACAG
pBR2	GGAGCCACTATCGACTAC
pBR3	TCCCCATCGGTGATGTC

5.2 Verwendete Plasmide und Stämme

5.2.1 Plasmide

Tab. 5.2.1.1: In dieser Arbeit verwendete Plasmide mit Kennzeichen und Angabe der Referenz

Name	Kennzeichen	Referenz
pDrive	<i>plac</i> , <i>ori</i> pUC, <i>lacZα</i> , Amp ^R , Km ^R , T-A cloning-Vektor	Qiagen, Hilden, Deutschland
pD cgl0632	pDrive mit Insertionsfragment cgl0632, Km ^R	Diese Arbeit
pD cgl1952	pDrive mit Insertionsfragment cgl1952, Km ^R	Diese Arbeit
pD cgl2310	pDrive mit Insertionsfragment cgl2310, Km ^R	Diese Arbeit
pD cgl2781	pDrive mit Insertionsfragment cgl2781, Km ^R	Diese Arbeit
pD rhtB 0146	pDrive mit Insertionsfragment cgl0146, Km ^R	Boltres 2009
pD rhtB 2344	pDrive mit Insertionsfragment cgl2344, Km ^R	Boltres 2009
pVWEx1	Km ^R , <i>lacIq</i> , <i>ptac</i> , <i>E. coli</i> – <i>C. glutamicum</i> shuttle vector	Peters-Wendisch <i>et al.</i> 2001
pVWEx1 rhtB 0146	pVWEx1 mit Gen cgl0146, Km ^R	Evonik Degussa GmbH
pVWEx1 rhtB 2344	pVWEx1 mit Gen cgl2344, Km ^R	Evonik Degussa GmbH
pVWEx1 rhtB 2656	pVWEx1 mit Gen cgl2656, Km ^R	Evonik Degussa GmbH
pEKex2	<i>ptac</i> , <i>lacIq</i> , Km ^R , <i>ori C. glut.</i> , <i>ori E. coli</i> <i>E. coli</i> – <i>C. glut.</i> Shuttle-Vektor	Eikmanns <i>et al.</i> 1991
pEKex2 rhtC	pEKex2 mit Gen <i>rhtC</i> aus <i>E. coli</i> , Km ^R	Diese Arbeit
pEKex2 His-rhtC	pEKex2 mit Gen <i>rhtC</i> aus <i>E. coli</i> und einem His-Tag am N-Terminus, Km ^R	Diese Arbeit
pEKex2 cgl1687-88 Strep	pEKex2 mit den Genen <i>cgl1687-88</i> und einem Strep-Tag am C-Terminus, Km ^R	Diese Arbeit
pEKex2 Prom cgl1687-88 Strep	pEKex2 mit dem Promotorbereich, den Genen <i>cgl1687-88</i> und einem Strep-Tag am C-Terminus, Km ^R	Diese Arbeit

5.2.2 Stämme

Tab. 5.2.2.1: In dieser Arbeit verwendete *E. coli*-Stämme. Der Genotyp bzw. Phänotyp sowie die Referenz der eingesetzten Stämme ist aufgeführt.

<i>E. coli</i>		
Bezeichnung	Genotyp, Phänotyp	Referenz
MG 1655	K12-Wildtyp λ - F- <i>rph</i> -1	Blattner <i>et al.</i> (1997),
DH5 α <i>mcr</i> ⁻	<i>endA1 supE44 thi-1 λ - recA1 gyrA96 relA1 deoR Δ (lacZYA-argF) U169 Φ80 Δ lacZ Δ M15mcrA Δ (mmr hsdRMS mcrBC)</i>	Grant <i>et al.</i> 1990

Tab. 5.2.2.2: In dieser Arbeit verwendete *C. glutamicum*-Stämme. Der Genotyp bzw. Phänotyp sowie die Referenz der eingesetzten Stämme ist aufgeführt. (Resistenzen: Km: Kanamycin; Nx: Nalidixinsäure)

<i>C. glutamicum</i>		
Bezeichnung	Genotyp, Phänotyp	Referenz
ATCC 13032	Wildtyp	Abe <i>et al.</i> 1967
:: <i>brnQ</i>	pDrive Insertion in <i>cgl</i> 2310, Km ^R	Diese Arbeit
:: <i>cgl0028</i>	pDrive insertion in <i>cgl0028</i> , Km ^R	Jolkver 2008
:: <i>cgl0067</i>	pDrive insertion in <i>cgl0067</i> , Km ^R	Jolkver 2008
:: <i>cgl0092</i>	pDrive insertion in <i>cgl0092</i> , Km ^R	Boltres 2009
:: <i>cgl0101</i>	pDrive insertion in <i>cgl0101</i> , Km ^R	Jolkver 2008
:: <i>cgl0110</i>	pDrive insertion in <i>cgl0110</i> , Km ^R	Jolkver 2008
:: <i>cgl0146</i>	pDrive insertion in <i>cgl0146</i> , Km ^R	Boltres 2009
:: <i>cgl0206</i>	pDrive insertion in <i>cgl0206</i> , Km ^R	Jolkver 2008
:: <i>cgl0225</i>	pDrive insertion in <i>cgl0225</i> , Km ^R	Jolkver 2008
:: <i>cgl0231</i>	pDrive insertion in <i>cgl0231</i> , Km ^R	Boltres 2009
:: <i>cgl0267</i>	pDrive insertion in <i>cgl0267</i> , Km ^R	Jolkver 2008
:: <i>cgl0283</i>	pDrive insertion in <i>cgl0283</i> , Km ^R	Jolkver 2008
:: <i>cgl0322</i>	pDrive insertion in <i>cgl0322</i> , Km ^R	Mohrbach 2006
:: <i>cgl0421</i>	pDrive insertion in <i>cgl0421</i> , Km ^R	Mohrbach 2006
:: <i>cgl0470</i>	pDrive insertion in <i>cgl0470</i> , Km ^R	Trötschel 2005
:: <i>cgl0481</i>	pDrive insertion in <i>cgl0481</i> , Km ^R	Mohrbach 2006
:: <i>cgl0590</i>	pDrive insertion in <i>cgl0590</i> , Km ^R	Becker 2007
:: <i>cgl0605</i>	pDrive insertion in <i>cgl0605</i> , Km ^R	Jolkver 2008
:: <i>cgl0635</i>	pDrive insertion in <i>cgl0635</i> , Km ^R	Trötschel 2005
:: <i>cgl0833</i>	pDrive insertion in <i>cgl0833</i> , Km ^R	Ballan 2007

Material und Methoden

::cgl0870	pDrive insertion in <i>cgl0870</i> , Km ^R	Jolkver 2008
::cgl0912	pDrive insertion in <i>cgl0912</i> , Km ^R	Ballan 2007
::cgl0924	pDrive insertion in <i>cgl0924</i> , Km ^R	Boltres 2009
::cgl0930	pDrive insertion in <i>cgl0930</i> , Km ^R	Jolkver 2008
::cgl0964	pDrive insertion in <i>cgl0964</i> , Km ^R	Jolkver 2008
::cgl0968	pDrive insertion in <i>cgl0968</i> , Km ^R	Trötschel, 2005
::cgl1005	pDrive insertion in <i>cgl1005</i> , Km ^R	Jolkver 2008
::cgl1010	pDrive insertion in <i>cgl1010</i> , Km ^R	Jolkver 2008
::cgl1061	pDrive insertion in <i>cgl1061</i> , Km ^R	Ballan, 2007
::cgl1076	pDrive insertion in <i>cgl1076</i> , Km ^R	Ballan, 2007
::cgl1080	pDrive insertion in <i>cgl1080</i> , Km ^R	Boltres 2009
::cgl1082	pDrive insertion in <i>cgl1082</i> , Km ^R	Jolkver 2008
::cgl1088	pDrive insertion in <i>cgl1088</i> , Km ^R	Jolkver 2008
::cgl1107	pDrive insertion in <i>cgl1107</i> , Km ^R	Trötschel 2005
::cgl1148	pDrive insertion in <i>cgl1148</i> , Km ^R	Jolkver 2008
::cgl1155	pDrive insertion in <i>cgl1155</i> , Km ^R	Trötschel 2005
::cgl1163	pDrive insertion in <i>cgl1163</i> , Km ^R	Jolkver 2008
::cgl1252	pDrive insertion in <i>cgl1252</i> , Km ^R	Ballan, 2007
::cgl1258	pDrive insertion in <i>cgl1258</i> , Km ^R	Jolkver 2008
::cgl1262	pDrive insertion in <i>cgl1262</i> , Km ^R	Jolkver 2008
::cgl1331	pDrive insertion in <i>cgl1331</i> , Km ^R	Trötschel 2005
::cgl1386	pDrive insertion in <i>cgl1386</i> , Km ^R	Jolkver 2008
::cgl1420	pDrive insertion in <i>cgl1420</i> , Km ^R	Boltres 2009
::cgl1436	pDrive insertion in <i>cgl1436</i> , Km ^R	Jolkver 2008
::cgl1460	pDrive insertion in <i>cgl1460</i> , Km ^R	Jolkver 2008
::cgl1502	pDrive insertion in <i>cgl1502</i> , Km ^R	Jolkver 2008
::cgl1522	pDrive insertion in <i>cgl1522</i> , Km ^R	Jolkver 2008
::cgl1554	pDrive insertion in <i>cgl1554</i> , Km ^R	Ballan 2007
::cgl1688	pDrive insertion in <i>cgl1688</i> , Km ^R	Boltres 2009
::cgl1952	pDrive insertion in <i>cgl1952</i> , Km ^R	Diese Arbeit
::cgl1982	pDrive insertion in <i>cgl1982</i> , Km ^R	Jolkver 2008
::cgl1993	pDrive insertion in <i>cgl1993</i> , Km ^R	Jolkver 2008
::cgl2018	pDrive insertion in <i>cgl2018</i> , Km ^R	Boltres 2009
::cgl2045	pDrive insertion in <i>cgl2045</i> , Km ^R	Jolkver 2008
::cgl2077	pDrive insertion in <i>cgl2077</i> , Km ^R	Ballan 2007
::cgl2089	pDrive insertion in <i>cgl2089</i> , Km ^R	Jolkver 2008
::cgl2131	pDrive insertion in <i>cgl2131</i> , Km ^R	Jolkver 2008
::cgl2145	pDrive insertion in <i>cgl2145</i> , Km ^R	Boltres 2009
::cgl2211	pDrive insertion in <i>cgl2211</i> , Km ^R	Jolkver 2008

Material und Methoden

::cgl2250	pDrive insertion in <i>cgl2250</i> , Km ^R	Boltres 2009
::cgl2314	pDrive insertion in <i>cgl2314</i> , Km ^R	Jolkver 2008
::cgl2318	pDrive insertion in <i>cgl2318</i> , Km ^R	Jolkver 2008
::cgl2323	pDrive insertion in <i>cgl2323</i> , Km ^R	Ballan 2007
::cgl2326	pDrive insertion in <i>cgl2326</i> , Km ^R	Jolkver 2008
::cgl2327	pDrive insertion in <i>cgl2327</i> , Km ^R	Jolkver 2008
::cgl2338	pDrive insertion in <i>cgl2338</i> , Km ^R	Jolkver 2008
::cgl2344	pDrive insertion in <i>cgl2344</i> , Km ^R	Boltres 2009
::cgl2385	pDrive insertion in <i>cgl2385</i> , Km ^R	Jolkver 2008
::cgl2386	pDrive insertion in <i>cgl2386</i> , Km ^R	Jolkver 2008
::cgl2460	pDrive insertion in <i>cgl2460</i> , Km ^R	Trötschel 2005
::cgl2499	pDrive insertion in <i>cgl2499</i> , Km ^R	Jolkver 2008
::cgl2512	pDrive insertion in <i>cgl2512</i> , Km ^R	Jolkver 2008
::cgl2551	pDrive insertion in <i>cgl2551</i> , Km ^R	Jolkver 2008
::cgl2572	pDrive insertion in <i>cgl2572</i> , Km ^R	Jolkver 2008
::cgl2595	pDrive insertion in <i>cgl2595</i> , Km ^R	Jolkver 2008
::cgl2629	pDrive insertion in <i>cgl2629</i> , Km ^R	Jolkver 2008
::cgl2637	pDrive insertion in <i>cgl2637</i> , Km ^R	Mohrbach, 2006
::cgl2654	pDrive insertion in <i>cgl2654</i> , Km ^R	Jolkver 2008
::cgl2656	pDrive Insertion in <i>cgl2656</i> , Km ^R	Konstruktion vom FZ Jülich
::cgl2685	pDrive insertion in <i>cgl2685</i> , Km ^R	Boltres 2009
::cgl2731	pDrive insertion in <i>cgl2731</i> , Km ^R	Jolkver 2008
::cgl2744	pDrive insertion in <i>cgl2744</i> , Km ^R	Jolkver 2008
::cgl2746	pDrive insertion in <i>cgl2746</i> , Km ^R	Boltres 2009
::cgl2781	pDrive insertion in <i>cgl2781</i> , Km ^R	Diese Arbeit
::cgl2831	pDrive insertion in <i>cgl2831</i> , Km ^R	Jolkver 2008
::cgl2858	pDrive insertion in <i>cgl2858</i> , Km ^R	Jolkver 2008
::cgl2867	pDrive insertion in <i>cgl2867</i> , Km ^R	Boltres 2009
::cgl2908	pDrive insertion in <i>cgl2908</i> , Km ^R	Jolkver 2008
::cgl2917	pDrive insertion in <i>cgl2917</i> , Km ^R	Jolkver 2008
::cgl2929	pDrive insertion in <i>cgl2929</i> , Km ^R	Jolkver 2008
::cgl3027	pDrive insertion in <i>cgl3027</i> , Km ^R	Jolkver 2008
::cgl3042	pDrive insertion in <i>cgl3042</i> , Km ^R	Jolkver 2008
::cgl3074	pDrive insertion in <i>cgl3074</i> , Km ^R	Jolkver 2008
::cgl3083	pDrive insertion in <i>cgl3083</i> , Km ^R	Jolkver 2008
$\Delta aceE \Delta ilvE$	Deletion von <i>aceE</i> und <i>ilvE</i>	AG Eikmanns, Uni Ulm
$\Delta aceE \Delta ilvE ::rhtB 0146$	$\Delta aceE \Delta ilvE$ mit pDrive Insertion in <i>cgl 0146</i> , Km ^R	Diese Arbeit
$\Delta aceE \Delta ilvE ::rhtB 2344$	$\Delta aceE \Delta ilvE$ mit pDrive Insertion in <i>cgl 2344</i> , Km ^R	Diese Arbeit

Material und Methoden

<i>ΔaceE ΔilvE pVWex1 rhtB 0146</i>	<i>ΔaceE ΔilvE</i>	Diese Arbeit
<i>ΔaceE ΔilvE pVWex1 rhtB 2344</i>	<i>ΔaceE ΔilvE</i>	Diese Arbeit
<i>ΔaceE ΔilvE pVWex1 rhtB 2656</i>	<i>ΔaceE ΔilvE</i>	Diese Arbeit
<i>ΔaceE ΔilvEpEKex2 rhtC</i>	<i>ΔaceE ΔilvE</i> mit Überexpression von <i>rhtC</i> , Km ^R	Diese Arbeit
<i>ΔaceE ΔilvE pEKex2 His-rhtC</i>	<i>ΔaceE ΔilvE</i> mit Überexpression von <i>His-rhtC</i> , Km ^R	Diese Arbeit
<i>ΔaceE ΔilvE pEKex2 Prom cgl 1687-88 Strep</i>	<i>ΔaceE ΔilvE</i> mit Überexpression von <i>Prom cgl1687-88 Strep</i> , Km ^R	Diese Arbeit
<i>ΔaceE ΔilvE pEKex2 cgl 1687-88 Strep</i>	<i>ΔaceE ΔilvE</i> mit Überexpression von <i>cgl1687-88 Strep</i> , Km ^R	Diese Arbeit
<i>ΔaceE ΔilvE ΔbrnFE</i>	<i>ΔaceE ΔilvE</i>	AG Eikmanns, Uni Ulm
<i>ΔltbR ΔilvE</i>	Deletion von <i>ltbR</i> und <i>ilvE</i>	AG Eikmanns, Uni Ulm
<i>ΔltbR ΔilvE pEKex2 rhtC</i>	<i>ΔltbR ΔilvE</i> mit Überexpression von <i>rhtC</i> , Km ^R	Diese Arbeit
<i>ΔltbR ΔilvE pEKex2 Prom cgl 1687-88 Strep</i>	<i>ΔltbR ΔilvE</i> mit Überexpression von <i>Prom cgl1687-88 Strep</i> , Km ^R	Diese Arbeit
<i>RES 167</i>	Restriktionsdefiziente Mutante von ATCC 13032; <i>Δ(cglIM-cglIR-cglIIR)</i> , Nx ^R	Tauch <i>et al.</i> 2002
<i>Res167 ::cgl0036</i>	Res 167 mit pDrive-Insertion in <i>cgl0036</i> , Km ^R	Boltres 2009
<i>Res167 ::cgl0216</i>	Res 167 mit pDrive-Insertion in <i>Cgl0216</i> , Km ^R	Boltres 2009
<i>Res167 ::cgl0235</i>	Res 167 mit pDrive-Insertion in <i>Cgl0235</i> , Km ^R	Boltres 2009
<i>Res167 ::cgl0406</i>	Res 167 mit pDrive-Insertion in <i>Cgl0406</i> , Km ^R	Konstruktion vom FZ Jülich
<i>Res167 ::cgl0501</i>	Res 167 mit pDrive-Insertion in <i>Cgl0501</i> , Km ^R	Boltres 2009
<i>Res167 ::cgl0533</i>	Res 167 mit pDrive-Insertion in <i>Cgl0533</i> , Km ^R	Boltres 2009
<i>Res167 ::cgl0632</i>	Res 167 mit pDrive-Insertion in <i>Cgl0632</i> , Km ^R	Diese Arbeit
<i>Res167 ::cgl0635</i>	Res 167 mit pDrive-Insertion in <i>Cgl0635</i> , Km ^R	Trötschel 2005
<i>Res167 ::cgl0855</i>	Res 167 mit pDrive-Insertion in <i>Cgl0855</i> , Km ^R	Boltres 2009
<i>Res167 ::cgl0912</i>	Res 167 mit pDrive-Insertion in <i>Cgl0912</i> , Km ^R	Ballan, 2007
<i>Res167 ::cgl0952</i>	Res 167 mit pDrive-Insertion in <i>Cgl0952</i> , Km ^R	Boltres 2009
<i>Res 167 ::cgl0964</i>	Res 167 mit pDrive-Insertion in <i>Cgl0964</i> , Km ^R	Jolkver 2009
<i>Res167 ::cgl0965</i>	Res 167 mit pDrive-Insertion in <i>Cgl0965</i> , Km ^R	Boltres 2009
<i>Res167 ::cgl1061</i>	Res 167 mit pDrive-Insertion in <i>Cgl1061</i> , Km ^R	Ballan, 2007
<i>Res167 ::cgl1080</i>	Res 167 mit pDrive-Insertion in <i>Cgl1080</i> , Km ^R	Boltres 2009
<i>Res167 ::cgl1147</i>	Res 167 mit pDrive-Insertion in <i>Cgl1147</i> , Km ^R	Boltres 2009
<i>Res 167 ::cgl1148</i>	Res 167 mit pDrive-Insertion in <i>Cgl1148</i> , Km ^R	Jolkver 2009
<i>Res167 ::cgl1227</i>	Res 167 mit pDrive-Insertion in <i>Cgl1227</i> , Km ^R	Boltres 2009
<i>Res167 ::cgl1420</i>	Res 167 mit pDrive-Insertion in <i>Cgl1420</i> , Km ^R	Ballan 2007

Material und Methoden

<i>Res167 ::cgl1432</i>	Res 167 mit pDrive-Insertion in <i>Cgl1432</i> , Km ^R	Boltres 2009
<i>Res 167 ::cgl1525</i>	Res 167 mit pDrive-Insertion in <i>Cgl1525</i> , Km ^R	Jolkver 2009
<i>Res167 ::cgl1567</i>	Res 167 mit pDrive-Insertion in <i>Cgl1567</i> , Km ^R	Boltres 2009
<i>Res 167 ::cgl1568</i>	Res 167 mit pDrive-Insertion in <i>Cgl1568</i> , Km ^R	Jolkver 2009
<i>Res167 ::cgl1688</i>	Res 167 mit pDrive-Insertion in <i>Cgl1688</i> , Km ^R	Boltres 2009
<i>Res167 ::cgl2012</i>	Res 167 mit pDrive-Insertion in <i>Cgl2012</i> , Km ^R	Boltres 2009
<i>Res167 ::cgl2018</i>	Res 167 mit pDrive-Insertion in <i>Cgl2018</i> , Km ^R	Boltres 2009
<i>Res167 ::cgl2057</i>	Res 167 mit pDrive-Insertion in <i>Cgl2057</i> , Km ^R	Boltres 2009
<i>Res167 ::cgl2077</i>	Res 167 mit pDrive-Insertion in <i>Cgl2077</i> , Km ^R	Ballan, 2007
<i>Res167 ::cgl2298</i>	Res 167 mit pDrive-Insertion in <i>Cgl2298</i> , Km ^R	Boltres 2009
<i>Res167 ::cgl2447</i>	Res 167 mit pDrive-Insertion in <i>Cgl2447</i> , Km ^R	Boltres 2009
<i>Res167 ::cgl2553</i>	Res 167 mit pDrive-Insertion in <i>Cgl2553</i> , Km ^R	Boltres 2009
<i>Res167 ::cgl2746</i>	Res 167 mit pDrive-Insertion in <i>Cgl2746</i> , Km ^R	Boltres 2009
<i>Res167 ::cgl2826</i>	Res 167 mit pDrive-Insertion in <i>Cgl2826</i> , Km ^R	Boltres 2009
<i>Res 167 ::cgl2831</i>	Res 167 mit pDrive-Insertion in <i>Cgl2831</i> , Km ^R	Jolkver 2009
<i>Res167 ::cgl2993</i>	Res 167 mit pDrive-Insertion in <i>Cgl2993</i> , Km ^R	Boltres 2009
<i>Res167 ::cgl3036</i>	Res 167 mit pDrive-Insertion in <i>Cgl3036</i> , Km ^R	Boltres 2009
<i>Res167 ::cgl3039</i>	Res 167 mit pDrive-Insertion in <i>Cgl3039</i> , Km ^R	Boltres 2009

5.3 Antibiotika

Folgende Konzentrationen an Antibiotika (s. Tab. 5.3.1) wurden für *C. glutamicum*- und *E. coli*-Mutanten in festem und in flüssigem Medium eingesetzt. Carbenicillin wurde nur beim Screening der *E. coli* Genbank eingesetzt und ist daher nur für *E. coli* angegeben.

Tab. 5.3.1: Verwendete Konzentrationen der Antibiotika Kanamycin und Carbenicillin bezogen auf den jeweiligen Organismus

Organismus	Kanamycin	Carbenicillin
<i>E. coli</i>	100 µg/mL	100 µg/mL
<i>C. glutamicum</i>	50 µg/mL	-

5.4 Lösungen und Medien

Alle nachfolgenden Chemikalien wurden von den Firmen Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, Deutschland) oder Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland) erworben. Alle Ausnahmen sind bei den jeweiligen Chemikalien genannt.

5.4.1 Lösungen

56/2 Salze (4x)

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,96 g
K_2HPO_4	20,9 g
NaHPO_4	15,6 g

pH 7,0 mit NaOH (5 M)
Add 1 L mit H_2O bd. und
autoklavieren.

MM1 b Salze (4x)

NaCl	12 g
K_2HPO_4	8 g
KH_2PO_4	8 g

pH 7,0 mit NaOH (5 M)
Add 1 L mit H_2O bd. und
autoklavieren.

MM1 k Salze (4x)

NaCl	12 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	20 g
K_2HPO_4	8 g
KH_2PO_4	8 g
Harnstoff	20 g

pH 7,0 mit NaOH (5 M)
Add 1 L mit H_2O bd. und
autoklavieren.

Acetat/ Essigsäure

K-Acetat	5 M
Essigsäure	11,5 mL
H_2O bd	28,5 mL

Biotin-Stammlösung (200 mg/mL)

Biotin	2 g
--------	-----

Add 10 mL mit 0,1 M NaOH und steril
filtrieren.

BCIP-Stammlösung

5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat-p-Toluidinsalz	0,5 g
---	-------

Dimethylformamid
(100%) 10 mL
Lagerung bei -20°C in Dunkelheit

CaCl_2 -Stammlösung (1%)

CaCl_2	1 g
-----------------	-----

Add 100 mL mit H_2O bd. und
autoklavieren.

CaNO_3 -Stammlösung (10 g/L)

CaNO_3	100 mg
-----------------	--------

Add 10 mL mit H_2O bd. und steril
filtrieren.

Coomassie-Färbelsg.

Serva blau G 0,5 g
Essigsäure 50 mL
MeOH (45%)/ 225 mL
EtOH(30%)
Add 500 ml mit H₂O bd.

Coomassie-Entfärber

Essigsäure 10%

FeSO₄-Stammlösung (0,5 g/L)

FeSO₄ 5 mg
Add 10 mL mit H₂O bd. und steril
filtrieren.

Glukose-Stammlösung (20%)

Glukose x H₂O 200 g
Add 1 L mit H₂O bd. und
autoklavieren.

K-Acetat-Stammlösung (50%)

K-Acetat 50 g
Add 100 mL mit H₂O bd. und steril
filtrieren.

MgSO₄-Stammlösung (100 g/L)

MgSO₄ x 7 H₂O 10 g
Add 100 mL mit H₂O bd. und steril
filtrieren.

MgSO₄-Stammlösung (250 g/L)

MgSO₄ x 7 H₂O 25 g
Add 100 mL mit H₂O bd. und
autoklavieren.

(NH₄)₂SO₄-Stammlösung(1 M)

(NH₄)₂SO₄ 13,2 g
Add 100 mL mit H₂O bd. und
autoklavieren.

NBT-Stammlösung

p-Nitrotetrazolium- 0,5 g
blauchlorid (NBT)
Dimethylformamid
(70%) 10 mL
Lagerung bei -20°C in Dunkelheit.

Stoplsg.

NaCl 8 g
KCl 0,2 g
Add 1 L mit H₂O bd.

Spurensalze

FeSO₄ 10 g
MnSO₄ 10 g
ZnSO₄ 1 g
CuSO₄ 0,2 g
NiCl₂ x 6H₂O 0,2 g
H₃BO₃ 0,09 g
CoCl₂ x 6H₂O 0,06 g
NaMoO₄ x 2H₂O 0,009g
Add 1 L mit H₂O bd. und steril
filtrieren.

Thiamin-Stammlösung (12 g/L)

Thiamin 120 mg
Add 10 mL mit H₂O bd. und steril
filtrieren.

5.4.2 Puffer

Blockierungspuffer

BSA 3 g
Add 100 mL mit Waschpuffer (1x)

DTT/ β -Mercaptoethanol 8 mM/ 4g

Bromphenolblau 0,04 g

Add 100 mL mit H₂O bd.

Elektrodenpuffer (4x)

Tris 12 g
Glycin 57,6 g
SDS 4 g

Add 1 L mit H₂O bd.

TAE-Puffer

Tris 40 mM

EDTA 0,5 mM

pH auf 7,5 mit Essigsäure.

TB Puffer

PIPES 605 mg 10 mM

CaCl₂ 333 mg 15 mM

KCl 3,725g 250mM

pH auf 6,7 mit KOH und Zugabe von 1,39 g MnCl₂ (55 mM)

Add 200 mL mL mit H₂O bd. und steril filtrieren.

Ladepuffer (6x)

Bromphenol Blau 0,03 %
Xylen Cyanol FF 0,03 %
Glycerin 60 %
EDTA 60 mM
Tris 10 mM

pH auf 7,6 mit HCl

Transferpuffer

CAPS 10 mM

Methanol (v/v) 10 %

pH auf 11,0 mit NaOH (5 M) und add 1 L mit H₂O bd.

MES/TRIS-Puffer

MES 4,88 g 50 mM
TRIS 3,03 g 50 mM
NaCl 0,29 g 10 mM
KCl 0,37 g 10 mM

pH auf 8.0 mit NaOH (5 M) und add 500 mL mit H₂O bd.

Trenngelpuffer

Tris 18,17g

SDS 0,3 g

pH auf 8,8 mit HCl und add 100 mL mit H₂O bd.

Probenpuffer (4x)

Tris 6 g
Glycerin 40 g
EDTA 148 mg

Sammelgelpuffer (4x)

Tris 6,0 g

SDS 0,3 g

Material und Methoden

pH auf 6,8 mit HCl und add 100 mL mit H₂O bd.

Waschpuffer (10x)

Tris	0,5 M
NaCl	9 %

pH auf 7,5 mit HCl und add 1 L mit H₂O bd.

5.4.3 Komplexmedien

Luria Bertani (LB)

[Sambrook *et al.* 1989]

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCL	10 g

Add 1 L mit H₂O bd. und anschließend autoklavieren.

2x Yeast Tryptone (YT)

Trypton	16 g
Hefeextrakt	10 g
NaCl	5 g

Add 1 L mit H₂O bd. und anschließend autoklavieren.

Brain-Heart-Infusion (BHI)

(Difco, Detroit, USA)

BHI-Pulver	37 g
------------	------

Add 1 L mit H₂O bd. und anschließend autoklavieren.

SOB Medium

Trypton	5 g
Hefeextrakt	1,25 g
NaCL	0,125 g
KCl (1 M)	625 µL

Add 250 mL mit H₂O bd. und anschließend autoklavieren.

Zugabe von 1,25 mL MgCl₂ (2 M, steril filtriert)

BHIS

BHI-Medium	100mL
Sorbitol	9,1 g

Steril filtrieren

Zur Herstellung von Agarplatten wurden jeweils 15 g/L Agar (Difco, Detroit, USA) hinzugefügt.

5.4.4 Minimalmedien

Als Glukosekonzentration wurde für *C. glutamicum* und *E. coli* Stämme standardmäßig 2% eingesetzt. Die Einzelkomponenten der Minimalmedien wurden unter sterilen Bedingungen zusammengefügt. Zur Herstellung von Agarplatten wurden jeweils 15 g/L Agar (Difco, Detroit, USA) hinzugefügt.

Material und Methoden

56/2

[Adelberg und Burns 1960]

56/2 Salze (4x) 250 mL

Glukose (20%) 100 mL

CaNO₃-Stmlsg. 1 mL

MgSO₄-Stmlsg. 2 mL

(100 g/L)

FeSO₄-Stmlsg 1 mL

Thiamin-Stmlsg 1 mL

Add 1 L mit H₂O bd.

MM1 basis (b)

MM1 b Salze (4x) 250 mL

Glukose (20%) 100 mL

(NH₄)₂SO₄-Stmlsg 50 mL

CaCl₂-Stmlsg. 1 mL

MgSO₄-Stmlsg. 1 mL

Spurensalze 1 mL

Biotin-Stmlsg 1 mL

Add 1 L mit H₂O bd.

MM1 komplett (k)

[Kase and Nakayama 1972]

MM1 k Salze (4x) 250 mL

Glukose (20%) 100 mL

CaCl₂-Stmlsg. 1 mL

MgSO₄-Stmlsg. 1 mL

Spurensalze 1 mL

Biotin-Stmlsg 1 mL

Add 1 L mit H₂O bd.

5.5 Physiologische Methoden

Für Wachstumstests in Mikrotiterplatten wurden 96 well Plates mit einem F-Profil (flach) und einem Kulturvolumen von 200 µL verwendet. Kultivierungen <5 mL wurden in Reagenzgläsern durchgeführt. Bis 20 mL Medium wurden 100 mL Schüttelkolben mit Schikanen (Schott, Mainz, Deutschland) verwendet.

5.5.1 Wachstumsversuche mit externer Zugabe von α-Ketosäuren in Mikrotiterplatten

Die verwendeten Stämme wurden zuerst von Agarplatte in 5 mL Komplexmedium transferiert und über Tag bei 30 °C und 125 rpm kultiviert (Vorkultur 1: VK1). Anschließend wurden 20 mL MM1 k mit 0,5 mL VK1 inokuliert und über Nacht bei 30 °C und 125 rpm inkubiert (Vorkultur 2: VK2). Die Zellen wurden 1 Mal mit MM1 basis gewaschen und in MM1 b Glc 50 mM (2x) resuspendiert und auf eine OD₆₀₀ von 0,4-0,5 eingestellt. In jedem „well“ wurden 100 µL Kultur und 100 µL einer doppelkonzentrierten α-Ketosäurelsg. Gemischt. Die Platten wurden mit einer gaspermeablen Folie (Breath-Easy, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) beklebt und bei 1200 rpm und 30°C inkubiert.

Das Wachstum wurde zu festgelegten Zeitpunkten mit dem Plattenlesegerät Victor™ 1420 (Wallac, jetzt PerkinElmer in Wellesley, Massachusetts, USA) bei 602 nm aufgenommen. Die erhaltenen Walac-Werte konnte für *C. glutamicum* mit der folgenden Gleichung umgerechnet werden.

$$OD_{600} = 3,0201 \cdot X^3 - 0,8596 \cdot X^2 + 3,1231 \cdot X - 0,2442 \quad [\text{Follmann 2008}]$$

Für *E. coli* wurde als Komplexmedium LB und als Minimalmedium 56/2 verwendet. Die folgende Gleichung konnte zur Umrechnung der Walac-Werte benutzt werden.

$$OD_{600} = 4,3211 \cdot X^3 - 2,6 \cdot X^2 + 3,8701 \cdot X - 0,2252 \quad [\text{Nettekoven 2009}]$$

Zur Bestimmung der Wachstumsrate wurde $\ln(OD_{600})$ gegen die Zeit aufgetragen und die Steigung bestimmt.

5.5.2 Wachstumsversuche mit externer Zugabe von α -Ketosauren in Schüttelkolben

Die verwendeten Stämme wurden zuerst von Agarplatte in 5 mL Komplexmedium transferiert und über Tag bei 30 °C und 125 rpm kultiviert (VK1). Anschließend wurden 20 mL MM1 k mit 0,5 mL VK1 inokuliert und über Nacht bei 30 °C und 125 rpm inkubiert (VK2). Die Zellen wurden 1 Mal mit 10 mL MM1 basis gewaschen und in MM1 k Glc 50 mM und der entsprechenden Konzentration der jeweiligen α -Ketosaure resuspendiert und die OD_{600} auf 2 (Verbrauchversuche OD_{600} von 4) eingestellt. Das Wachstum wurde über die optische Dichte bei 600 nm verfolgt. Für die Bestimmung der α -Ketosauren im Medium wurden 500 μ L Kultur abzentrifugiert (2 min 14000 rpm, RT). Der Überstand wurde abgenommen und erneut bei 14000 rpm und 4°C für 30 min zentrifugiert. 50 μ L wurden in ein HPLC-Probegefäß transferiert und vermessen, der Rest wurde bei -20°C gelagert.

5.5.3 Wachstumsversuche auf Gradientenplatten der α -Ketosauren

Die Gradientenplatten wurden aus zwei unterschiedlichen Medien hergestellt. Zuerst wurden 15 mL bei runden Petrischalen (d: 8,5 cm) oder 25 mL bei rechteckigen Petrischalen (Novagen, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) MM1 b Medium mit 10 g/L Agar (Difco, Detroit, USA) in die Petrischale gegossen. Dann wurde die Petrischale

mit der Seite, an der die höchste Konzentration später sein sollte, auf eine 5 mm dicke Unterlage gestellt, bis der Agar fest geworden war. Das zweite Medium bestand auch aus 15 bzw. 25 mL MM1 b mit 10 g/L Agar, zusätzlich war jedoch noch die höchste Konzentration des Gradienten an einer α -Ketosäure enthalten. Die Petrischale wurde wieder gerade hingestellt und das zweite Medium eingefüllt. Dieses Verfahren konnte auch für andere Medienbestandteile, wie z.B. IPTG angewendet werden.

Die untersuchten Stämme wurden erst in Komplex- und dann in MM1 k Medium für *C. glutamicum* bzw. 56/2 Medium für *E. coli* vorkultiviert, mit MM1 b auf eine OD₆₀₀ von 0,5 eingestellt und auf die Gradientenplatte entweder großflächig oder als Reihe einzelner Tropfen (3 μ L) aufgetragen.

5.6 Gentechnische Methoden

5.6.1 Herstellung kompetenter *E. coli DH5 α* Zellen

E. coli DH5 α Zellen wurden in 5 mL LB-Medium transferiert und über Tag bei 37 °C und 125 rpm inkubiert. 1 mL dieser Kultur wurde zum Animpfen von 250 mL SOB-Medium in einem 2 L Schüttelkolben mit Schikanen verwendet. Dieser wurde über Nacht bei Raumtemperatur und 125 rpm inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,6 oder mehr wurde die Kultur in 50 mL Falcons überführt, 10 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 2500 rpm und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 80 mL eiskaltem TB-Puffer resuspendiert. Danach wurden die Zellen wieder bei 2500 rpm und 4°C abzentrifugiert und in 20 mL frischem TB-Puffer resuspendiert. 1,4 mL DMSO wurden tropfenweise hinzugefügt und die Kultur 10 min auf Eis inkubiert. Es wurden 100 μ L Aliquots in 1,5 mL Eppendorfcaps angelegt und in flüssigem N₂ tiefgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

5.6.2 Transformation kompetenter *E. coli DH5 α* Zellen

1 μ L DNA wurden zu einem gefrorenen Aliquot kompetenter *E. coli DH5 α* Zellen transferiert und 45 min auf Eis inkubiert. Dann wurden die Zellen 45 s bei 42°C geschockt und anschließend wieder für 5 min auf Eis inkubiert. Es wurde 1 mL LB-Medium hinzugefügt und 1-2 h bei 37°C und 125 rpm kultiviert. Die Zellen wurden bei 11000 rpm für 1 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen im Rücklauf resuspendiert und auf einer LB-Agarplatte mit 100 μ g/ μ L Kanamycin bzw. 100

µg/mL Carbenicillin bei der *E. coli* Genbank ausgestrichen. Die Inkubation fand anschließend bei 37°C statt.

5.6.3 Blau-Weiß-Screening

Bei Transformationen mit dem pDrive-Vektor konnte auch ein Blau-Weiß-Screening durchgeführt werden. Dafür wurden die transformierten Zellen nach der Kultivierung in LB abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 12,5 µL IPTG (100 mM) und 50 µL X-Gal (40 mg/mL, gelöst in Dimethylformamid) resuspendiert und auf einer LB-Agarplatte mit 100 µg/µL Kanamycin ausgestrichen. Die Inkubation fand anschließend bei 37°C statt.

5.6.4 Herstellung kompetenter *C. glutamicum* Zellen

Zu 5 mL LB-Medium wurden 0,5 mL Glukose-Lsg (20%) hinzugefügt und mit *C. glutamicum* Zellen des entsprechenden Stammes von Agarplatte inokuliert. Diese Vorkultur (VK1) wurde über Nacht bei 30°C und 125 rpm inkubiert. 0,5 mL von VK1 wurden in 20 mL LB-Medium, das zuvor mit 2 mL Glukose-Lsg (20%) versetzt wurde, transferiert und bei 30°C und 125 rpm kultiviert. 250 mL LB-Medium wurden mit 2,5% (6,25 g) Glycin und 0,1% (0,25 g) Tween 80 versetzt und autoklaviert. 1 g Isonicotinsäurehydrazid wurde in 10 mL H₂O bd. gelöst, steril filtriert und dem Medium zugefügt. Anschließend wurden das Medium und die gesamte 2. Vorkultur in einen 2 L Schüttelkolben mit Schikanen überführt und über Nacht bei Raumtemperatur und 140 rpm geschüttelt. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von ca. 1 wurde die Kultur in 50 mL Falcons überführt und ca. 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 4000 rpm und 4°C abzentrifugiert und 5 Mal mit eisgekühltem 10%igen Glycerin gewaschen. Dabei sollten die Zellen schlussendlich auf ein Falcon gepoolt werden. Die Zellen wurden in 1 mL eisgekühltem 10%igem Glycerin resuspendiert und zu je 55 µL in 1,5 mL Eppendorfcaps aliquotiert. Diese wurden in flüssigem N₂ schockgefroren und danach bei -80°C gelagert.

5.6.5 Elektroporation kompetenter *C. glutamicum* Zellen

Ein Aliquot kompetenter *C. glutamicum* Zellen wurde auf Eis aufgetaut und mit 1 µL DNA versetzt. Die Zellen wurden in eine Elektroporationsküvette (Spalt 2 mm) transferiert und bei 2,5 kV elektroporiert. Anschließend wurden die Zellen mit 1 mL

BHIS-Medium versetzt und in ein 15 mL Falcon-Röhrchen überführt. Nach einem Hitzeschock für 6 min bei 46°C wurden die Zellen für mindestens 2 h bei 30°C und 125 rpm inkubiert. Anschließend wurde das Medium abzentrifugiert (5 min 4000 rpm RT), der Überstand abgenommen und die Zellen im Rücklauf resuspendiert. Die Zellen wurden dann auf eine antibiotikahaltige BHI-Agarplatte ausgestrichen und bei 30°C inkubiert.

5.6.6 Isolation genomischer DNA

3 mL einer *C. glutamicum*- oder *E. coli*-Übernachtskultur wurden abzentrifugiert (4°C 14000 rpm, 1 min), der Überstand verworfen und die Zellen in 200 µL H₂O bd resuspendiert. Nach der Zugabe von 200 µL Roti-Phenol wurde die Mischung für 10 min bei 65°C inkubiert, gemischt und auf Eis heruntergeköhlt. Es wurden 200 µL Chloroform hinzugefügt und für 10 min bei 4°C und 14000 rpm zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen und erneut mit 200 µL Chloroform gewaschen. Mit 150 µL Acetat/Essigsäure und 1 mL Ethanol (98%) wurde die DNA für mindestens 30 min gefällt. Die DNA wurde durch Zentrifugation (15 min, 4°C, 14000 rpm) abgetrennt, mit 200 µL Ethanol (70%) gewaschen, an der Luft getrocknet und in 50 µL H₂O bd gelöst.

Als Template in PCR-Ansätzen wurde die DNA zuvor 1:100 verdünnt.

5.6.7 PCR

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde die „polymerase chain reaction“ [PCR, Mullis *et al.* 1986] eingesetzt. Zur Überprüfung von Mutanten oder Plasmiden wurde der Taq PCR Master Mix (Eppendorff, Hamburg, Deutschland) laut Herstellerangaben verwendet. Zur Herstellung von Überexpressionsmutanten wurde die Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (NEB, Frankfurt a. Main, Deutschland) laut Herstellerangaben eingesetzt. Die Primer wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) hergestellt und laut Herstellerangaben in H₂O bd resuspendiert. Anschließend wurde eine 1:10 Verdünnung erstellt, wovon 1 µL in einem 10 µL Ansatz einer PCR eingesetzt wurde. Die Annealing-Temperatur wurde jeweils 5°C unter der Schmelztemperatur des Primers (Angabe des Hersteller) gewählt.

Zur direkten Überprüfung von Kolonien, wurden die Zellen in 100 µL H₂O bd. resuspendiert und für 15 min bei 95°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (14000 rpm, 1 min) und 1 µL des Überstandes in der PCR eingesetzt.

Das Standard-Programm der PCR sah folgendermaßen aus:

1. 94°C 4 min
2. 94°C 30 s
3. 55-65°C 1 min + 1 min je 1000 bp
4. 72°C 1,5 min

Schritte 2-4 30 x

5. 72°C 10 min
6. 4°C ∞

5.6.8 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Agarose-Gelelektrophorese wurde ein 1%iges Agarosegel eingesetzt. Die Proben wurden mit 6x Loading Dye (MBI Fermentas, St. Leon-Roth, Deutschland) versetzt und aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurde das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt und mit dem Image Master VDS System (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) dokumentiert. Die DNA wurde mit dem NucleoSpin Extract Kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) aus dem Gel eluiert. Dafür wurden 30 µL H₂O bd eingesetzt.

5.6.9 Restriktion von DNA

Zur Restriktion von DNA wurden die Enzyme (NEB, Frankfurt a. Main, Deutschland; MBI Fermentas, St. Leon-Roth, Deutschland) mit den entsprechenden Puffern laut Herstellerangabe eingesetzt. Um Religation von Plasmiden zu verhindern wurden zusätzlich 1 µL Antarctic Phosphatase (NEB, Frankfurt a. Main, Deutschland) zur Dephosphorylierung der 5'-Enden hinzugefügt. Die DNA wurde anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese gereinigt und aus dem Gel eluiert.

5.6.10 Ligation von DNA

Für die Ligation von PCR-Fragmenten mit dem Vektor pDrive mittels A-T-Klonierung wurde das QIAGEN PCR Cloning Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) laut Herstellerangaben mit einem Ansatz von 10 µL verwendet.

Für die Ligation von PCR-Fragmenten und dem Überexpressionsvektor pEKex2 wurde nach der Restriktion beider Komponenten die T4 DNA Ligase (MBI Fermentas, St. Leon-Roth, Deutschland) laut Herstellerangaben verwendet.

5.6.11 Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

5 mL LB-Medium wurden mit dem entsprechenden *E. coli*-Stamm angeimpft und bei 37°C und 125 rpm über Nacht inkubiert. 4 mL Kultur wurden anschließend laut Angabe des Herstellers zur Plasmidisolation mit dem Kit NucleoSpin Plasmid DNA Purification (Macherey&Nagel, Düren, Deutschland) benutzt. Zur Elution des Plasmids wurden standardmäßig 30 µL H₂O bd eingesetzt.

5.6.12 Konstruktion von Insertionsmutanten

Mit PCR wurde ein ca. 500 bp großes Fragment des jeweiligen Gens amplifiziert, mittels Gelelektrophorese gereinigt und in den Vektor pDrive (Qiagen, Hilden, Deutschland) ligiert (s. 5.6.10). 5 µL der Ligation wurden zur Transformation von 100 µL kompetenter *E. coli DH5α* verwendet. Mittels Blau-weiß-Screening wurden die Klone, welche das Insert enthielten isoliert und zur Animpfen von 5 mL LB für die Plasmidisolation (s. 5.6.11) verwendet. Zur Elution wurden 30 µL verwendet. Anschließend wurde ein Aliquot kompetenter *C. glutamicum* Zellen mit 1 µL des Plasmids transformiert und auf kanamycinhaltigen Agarplatten ausgestrichen. Die Klone, die nach Rekombination des Plasmids ins Genom, erhaltenen wurden mittels PCR überprüft. Dafür wurde ein Primer, der im Genom ca. 100 bp upstream von dem gewünschten Insert band, in Kombination mit jeweils einem M13 Primer, die spezifisch an pDrive binden, verwendet. Nur eine der Kombinationen durfte ein PCR-Produkt ergeben.

5.6.13 Konstruktion von Überexpressionsmutanten

Für die Konstruktion von Überexpressionsplasmiden wurde das gewünschte Gen exakt mittels PCR amplifiziert. Die verwendeten Primer enthielten zusätzlich Schnittstellen von Restriktionsenzyme und jeweils am 5'- oder 3' Ende einen Tag. Für die PCR wurde die Phusion Polymerase verwendet, da ihre Fehlerquote niedriger als bei der Taq-Polymerase ist. Das PCR-Fragment wurde durch Agarose-Gelelektrophorese gereinigt und aus dem Gel eluiert. Das PCR-Fragment und der entsprechende Überexpressionsvektor wurden mit Restriktionsenzymen geschnitten und über Nacht bei 16°C ligiert. Zur Vervielfältigung des Plasmids wurde *E. coli DH5α* damit transformiert und die Plasmide von 2-3 Klonen isoliert. Die Plasmide wurden sequenziert und das korrekte Plasmid zur Elektroporation von *C. glutamicum* verwendet.

5.6.14 Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmiden oder PCR-Fragmenten wurde von der Firma GATC Biotech AG (Konstanz, Deutschland) durchgeführt.

Für die Sequenzierung der AHAS-Gene aus den Spontanmutanten von *C. glutamicum* wurden mit den Primerkombinationen ilvBNC 1 und ilvBNC 5 c sowie ilvBNC 6 und ilvBNC 9 c pro Mutante 2 PCR-Fragmente hergestellt. 50-100 ng PCR-Fragment wurden dann mit den Primern ilvBNC 1(b), 2(b), 3(b), 4(b), 5(b) bzw. ilvBNC 6, 7, 8, 9 sequenziert

5.7 Biochemische Methoden

5.7.1 Importmessungen von ^{14}C -markiertem Isoleucin

Die zu untersuchenden Stämme wurden in 5 mL Komplexmedium angeimpft und über Tag bei 30°C und 125 rpm inkubiert (VK1). 0,5 mL VK1 wurden in 20 mL MM1 k transferiert und bei 30°C und 125 rpm über Nacht inkubiert (VK2). 20 mL MM1 k wurden mit VK2 auf eine OD_{600} von 2 angeimpft und für ca. 4 h bei 30°C und 125 rpm geschüttelt bis eine OD_{600} von 5-6 erreicht wurde. Die Zellen wurden 2 Mal mit je 10 mL MES/TRIS-Puffer (eiskühlt) gewaschen (5 min 4000 rpm 4°C) und in 10 mL eiskühlten MES/TRIS-Puffer resuspendiert. Anschließend wurde mit MES/TRIS-Puffer die OD_{600} auf 2 eingestellt.

Zur Bestimmung von K_M und V_{\max} wurden 1,12 mL Kultur mit 60 μL Glukose (200 mM) versetzt und im Wasserbad unter Rühren für 3 min bei 30°C inkubiert. Dann wurden 10 μL einer bestimmten Konzentration (Endkonzentration 1-50 μM) des unmarkierten Ile und 10 μL des ^{14}C -markierten Ile (Amersham) hinzugefügt. Die Konzentration des markierten Ile wurde so eingestellt, dass die eingesetzten 10 μL 20000 counts beinhalten (0,02 mM ^{14}C -Ile). Zu 4 festgelegten Zeitpunkten (30 s, 1 min, 2 min, 3 min) wurden jeweils 200 μL Kultur entnommen und die Zellen über ein Filtersystem (0,2 μm , Millipore, Eschborn) vom Medium abgetrennt. Anschließend wurden die Zellen 2 Mal mit 2,5 mL 0,1 M LiCl gewaschen und mit dem Filter in ein Szintillationsröhrchen transferiert. Zusätzlich wurden 200 μL Kultur direkt in ein Messröhrchen überführt zur Bestimmung der „total counts“.

Für die Aufnahmemessungen von Ile in Anwesenheit jeweils einer α -Ketosäure wurden 1,06 mL Kultur verwendet, mit 60 μL Glukose (200 mM) versetzt und im Wasserbad unter Rühren für 3 min bei 30°C inkubiert. Da bei diesem Experiment im V_{\max} -Bereich

gemessen werden sollte wurde als Endkonzentration für ^{13}C -Ile 50 μM gewählt. Nach 3 min Inkubation wurden 10 μL ^{13}C -Ile, 10 μL ^{14}C -Ile (s.o.) und 60 μL α -Ketosäurelsg. (Endkonzentration 5 mM, 100-facher Überschuss) hinzugefügt. Die Probenahme wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt.

Die Proben wurden mit 3,8 mL Szintillationslösung (Ecoszint, Roth, Karlsruhe) versetzt, kurz gemischt und mit Program 9 des Szintillationsmessgerätes (LS 6500, Beckman Instruments GmbH, München) vermessen.

Die gemessenen „counts per minute“ (cpm) wurden mit folgender Formel in die spezifische Stoffmenge (nmol/mg BTM) umgerechnet.

$$Y [\text{nmol/mg BTM}] = \frac{\text{cpm} * ((c[^{13}\text{C}\text{-Ile}; \mu\text{M}] + c[^{14}\text{C}\text{-Ile}; \mu\text{M}]) * V [\text{mL}]) * 1000}{\text{total counts} * V [\text{mL}] * 0,36 [\text{mg/mL}] * \text{OD}_{600}}$$

V = Probevolumen 0,2 mL

OD₆₀₀ = optische Dichte der Kultur

0,36 = Trockengewicht-Relation von *C. glutamicum* bei OD=1

Zur Bestimmung der Aufnahmerate wurde die spezifische Stoffmenge gegen die Zeit aufgetragen und die Steigung ermittelt.

5.7.2 Exportmessung der α -Ketosäuren

Die entsprechenden Stämme wurden zuerst von Agarplatte in 5 mL Komplexmedium (bei $\Delta aceE$ -Hintergrund mit 1% K-Acetat) transferiert und über Nacht bei 30 °C und 125 rpm kultiviert (VK1). Anschließend wurden 20 mL Komplexmedium (bei $\Delta aceE$ -Hintergrund mit 1% K-Acetat) mit VK1 auf eine OD₆₀₀ von 2 inokuliert und für ca. 3 h bei 30 °C und 125 rpm inkubiert (VK2). Die Zellen wurde n 1x mit 10 mL MM1 k Salze (1x) gewaschen, anschließend in MM1 k Medium resuspendiert (bei $\Delta aceE \Delta ilvE$ -Hintergrund mit 1 mM Ile, Leu und Val) und auf eine OD₆₀₀ von 4 eingestellt. Bei Zellen mit Überexpressionsplasmid wurden zusätzlich noch 25-100 μM IPTG zugegeben. Die Kultur wurde für ca 2 h bei 125 rpm und 30°C inkubiert um in den Zellen noch vorhandenes Acetat (bei $\Delta aceE$) oder BCAA (bei $\Delta ltbR$) aufzubrauchen und die Zellen in den „steady-state“-Zustand zu überführen. Die Zellen wurden erneut mit 10 mL MM1 k Salze (1x) gewaschen, in MM1 k Medium resuspendiert und auf eine OD₆₀₀ von 4 eingestellt. Zum Zeitpunkt 0 h und zu weiteren Zeitpunkten wurden Proben für die

Material und Methoden

Bestimmung der externen und internen Konzentration an α -Ketosäuren und Glukose genommen. Zusätzlich wurde noch die OD₆₀₀ zu jedem Zeitpunkt ermittelt. Für die Bestimmung externer und interner Konzentrationen wurden 3x 200 μ L in Silikonölröhrchen überführt, die bereits 30 μ L 20%ige Perchlorsäure und 70 μ L Silikonöl ($\rho = 1,04$ g/mL) befüllt waren. Die Zellen wurden bei 40000 rpm und RT für 40 s abzentrifugiert. Das Medium wurde gepoolt und für 30 min bei 14 rpm und 4°C erneut zentrifugiert, um verbliebene Zellen vor der HPLC-Messung abzutrennen. 50 μ L Medium wurden in HPLC- Probengefäß mit Einsatz überführt und in der HPLC vermessen. Das restliche Medium wurde bei -20°C gelagert. Die Silikonölröhrchen mit den Zellen wurden in der Silikonölphase durchtrennt und die Spitzen in ein 2 mL Eppendorfcap überführt. Die Zellen wurden bei 14000 rpm und RT für 1 min abzentrifugiert und die beiden oberen Spitzen entfernt. Es wurden 135 μ L H₂O bd. und 100 μ L Silikonöl ($\rho = 1,06$ g/mL) hinzugefügt, die Zellen resuspendiert und für 10 min im Ultraschallbad aufgeschlossen. Zur Neutralisation der Perchlorsäure wurden 75 μ L 5 M KOH/TEA hinzu pipettiert und der gesamte Aufschluss gevortext. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 4°C und 14000 rpm für 30 min wurden 50 μ L des Überstandes in ein HPLC-Probengefäß transferiert und vermessen. 100 μ L des Überstandes wurden bei -20°C gelagert.

Zur Bestimmung des Exportmechanismus wurden entweder 20 μ M Valinomycin und 5 μ M Nigericin oder 2 mM o-Vanadat nach ca. 1 h der Messung zugegeben.

Die interne Konzentration an α -Ketosäuren konnte mit der folgenden Formel berechnet werden.

$$c \text{ [mM]} = \frac{\text{HPLC-Wert } [\mu\text{M}] * 300}{2 \text{ } [\mu\text{g/mL}] * 0,36 \text{ [mg/mL]} * \text{OD}_{600} * 0,6 \text{ [mL]} * 1000}$$

HPLC-Wert = ermittelte Konzentration in der Probe anhand einer Kalibrierungsreihe

300 = Verdünnungsfaktor, der sich durch die Aufarbeitung ergibt

OD₆₀₀ = optische Dichte der Kultur

0,36 = Trockengewicht-Relation von *C. glutamicum* bei OD=1

0,6 = Volumen der Probe

2 = Zellvolumen von *C. glutamicum*

5.7.3 SDS-Gelelektrophorese (nach Lämmli, 1970)

5 mL BHI-Medium wurden mit Zellen von einer Agarplatte angeimpft und über Tag bei 30°C und 125 rpm inkubiert. Mit 0,5-1 mL Vorkultur wurden 20-50 mL MM1 k Glc 2% angeimpft und über Nacht bei 30°C und 125 rpm kultiviert. Die Zellen wurden abzentrifugiert (4000 rpm 5 min 4°C) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 500 µL Waschpuffer resuspendiert. Davon wurden 600 µL in ein Fast-prep-Röhrchen mit Glasperlen überführt und 3x für 30 s auf Stufe 6,5 in der Fast-Prep aufgeschlossen. Zwischen den Läufen wurde der Aufschluss auf Eis gekühlt. Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (15 min 14000 rpm 4°C) und 120 µL überstand mit 40 µL Probenpuffer (4x) versetzt und für 10 min bei 95°C inkubiert. 50 µL der Proben und der Protein Marker Page Ruler™ Prestained Protein Ladder (MBI Fermentas, St. Leon-Roth, Deutschland) auf das SDS-Gel aufgetragen. Das SDS-Gel bestand aus einem 12%igen Trenngel und einem 4%igen Sammelgel (s. Tab. 5.7.3.1). Nach der Elektrophorese wurde das Gel entweder mit Coomassie Brilliant Blau gefärbt oder zur Westernblot-Analyse eingesetzt.

Tab. 5.7.3.1 Zusammensetzung eines 12%igen Sammelgels und eines 4%igen Trenngels

Komponente	Sammelgel	Trenngel
Acrylamid-BisA (30% AA, 0,8% BisA)	1,35 mL	12 mL
Trenngel-/Sammelgelpuffer (4x)	2,5 mL	7,5 mL
APS 10%	0,05 mL	0,1 mL
TEMED	0,01 mL	0,25 mL
H ₂ O bd.	6,2 mL	10,4 mL

5.7.4 Coomassie-Brilliant-Blau Färbung

Das SDS-Gel wurde 30 min mit der Coomassie-Färbelsg. inkubiert. Überschüssiger Farbstoff wurde über Nacht in Coomassie-Entfärber entfernt.

5.7.5 Western Blot-Analyse

Die Übertragung der Proteine aus dem SDS-Polyacrylamid-Gel auf eine PVDF-Membran (Immobilon P, Porengröße 0,45 µm, Millipore, Bedford) wurde mit dem semi-dry-Blotverfahren (Kyhse-Andersen, 1984) durchgeführt. Dazu wurde das Protein-Gel 30 min lang in Transferpuffer äquilibriert und die Membran kurz in 60%igem Methanol

inkubiert. Anschließend wurde die Membran auf einen Stapel aus fünf in Transferpuffer getränkten Filter-Papieren (Schleicher & Schuell, Dassel) in eine "semi-dry-Blot"-Apparatur gelegt, und das Proteingel luftblasenfrei aufgelegt. Darüber wurde weiterer Stapel aus fünf mit Transferpuffer befeuchteten Filter-Papieren gelegt, und der Proteintransfer auf die Membran bei einer Stromstärke von 0,8 mA pro cm² Oberfläche eine Stunde lang durchgeführt. Eine Kontrolle des Proteintransfers war durch die dreiminütige reversible Proteinfärbung der Membran mit Ponceau Rot (0,2 % in 2%iger Essigsäure) und anschließendem Entfärben in Wasser möglich. Daraufhin wurde die Membran zunächst für eine Stunde in Blockierungspuffer bei Raumtemperatur inkubiert und dann, nach zweimaliger Waschung, für eine weitere Stunde in Blockierungspuffer mit dem ersten Antikörper (Anti-Strep, 1:5000, Sigma-Aldrich) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer für je 5 min wurde die Membran für eine Stunde mit dem zweiten Antikörper inkubiert. Für die Detektion der Signale wurde die an den zweiten Antikörper konjugierte alkalische Phosphatase (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland) genutzt. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer für je 5 min wurden 60 µl NBT-Stammlösung (NBT-Pulver, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) und 30 µl BCIP-Stammlösung (BCIP-Pulver, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) in 10 ml Inkubationspuffer verdünnt und auf die Membran gegeben. Die Membran wurde bis zur gewünschten Signalstärke im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert und die Reaktion mit einer Stopp-Lösung beendet.

5.8 Analytische Methoden

5.8.1 HPLC

Anlage:	Ez Chrome Elite (VWR, Darmstadt, Deutschland)
Laufmittel:	0,01 M H ₂ SO ₄ isokratisch
Probevolumen:	10 µL
Ofentemp.:	40°C
Säule:	Nucleogel Sugar 810H (Macherey&Nagel, Düren, Deutschland)
UV-Detektor	210 nm
Laufzeit:	30 min
Flow:	0,5 mL/min

5.9 Bioinformatische Tools

Pairwise Protein alignment:

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/align/index.html>

Vorhersage von Transmembrandomänen:

<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>

Genomic Blast:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi

6 Ergebnisse

Der Import und Export der BCAA (branched-chain amino acids) wurde bereits ausführlich untersucht. Über den Transport der Aminosäurevorstufen insbesondere der α -Ketosäuren ist jedoch nichts bekannt. Daher sollte untersucht werden in wie weit *C. glutamicum* die α -Ketosäuren im- oder exportierte und welche Transportsysteme dafür zuständig sind. Der erste Ansatzpunkt für den Import war das Wachstum von *C. glutamicum* in Anwesenheit der α -Ketosäuren.

6.1 Einfluss von α -Ketosäuren auf das Wachstum von *C. glutamicum*

Um das Verhalten von *C. glutamicum* ATCC 13032 (*C. glutamicum*) gegenüber den α -Ketosäuren zu untersuchen wurden Wachstumstests in Anwesenheit jeweils einer α -Ketosäure in Mikrotiterplatten durchgeführt. Zuerst wurde das Wachstum auf Minimalmedium mit jeweils einer α -Ketosäure als alleinige C-Quelle (50 mM) untersucht. Es konnte jedoch kein Wachstum festgestellt werden. Auch bei 50 mM Glukose als zusätzliche C-Quelle wurde für KIL und KIC kein Wachstum beobachtet. Bei 50 mM KIV und 50 mM Glukose konnte jedoch langsames Wachstum von OD₆₀₀ 0,3 auf 0,6 gemessen werden (s. Abb. 6.1.1).

Demnach führten 50 mM KIV zu einem verringerten Wachstum von *C. glutamicum* auf 50 mM Glukose im Vergleich zu Wachstum nur auf 50 mM Glukose. 50 mM KIL oder KIC neben 50 mM Glukose führten zu einer absoluten Wachstumsinhibition von *C. glutamicum*.

Es sollte nun untersucht werden, ob die Wachstumsinhibition durch die Aufnahme der α -Ketosäuren und daher durch einen internen Effekt bewirkt wurde oder ob die α -Ketosäuren extern das Wachstum von *C. glutamicum* inhibierten. Dafür wurde die Abnahme der externen α -Ketosäure-Konzentration bei Wachstum von *C. glutamicum* auf 50 mM Glukose und in Anwesenheit von 10 mM jeweils einer α -Ketosäure gemessen. Dieser Versuch wurde in Schüttelkolben durchgeführt, da aus Mikrotiterplatten keine Probenahme für die HPLC möglich war. Zusätzlich sollte dieser Versuch mit einer Start-OD von 4 durchgeführt werden, um einen Verbrauch der α -Ketosäuren zu erhalten, der mit der angewandten HPLC-Methode messbar war. Bei so hohen OD-Werten war eine OD-Messung in Mikrotiterplatten nicht mehr möglich.

Ergebnisse

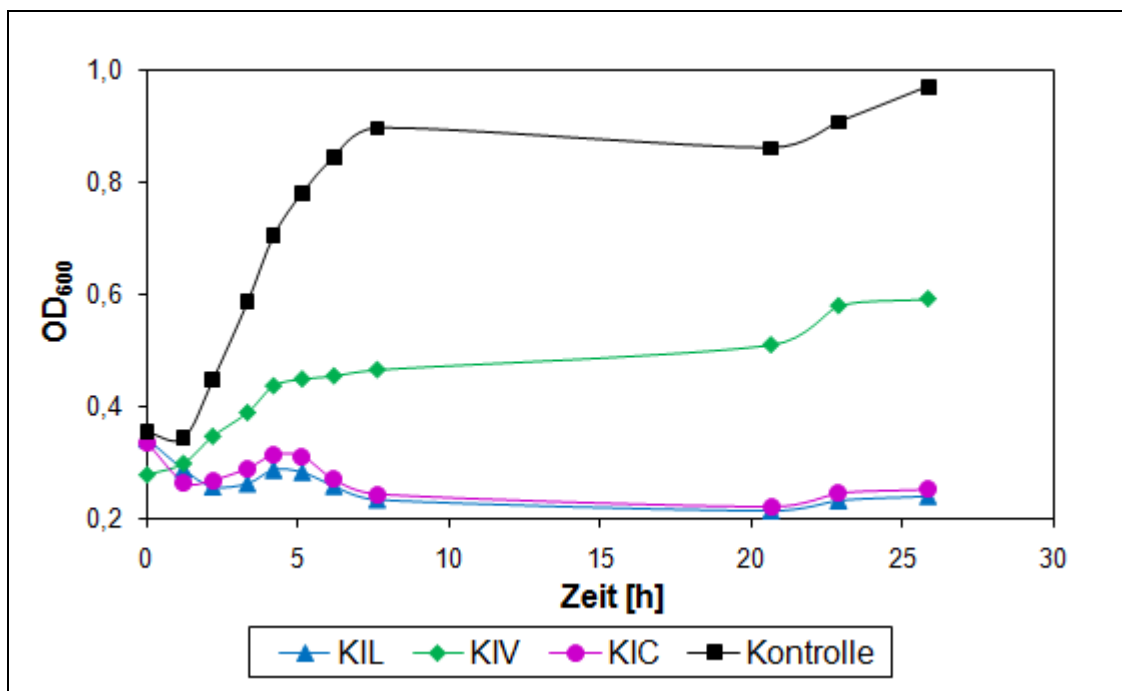


Abb. 6.1.1: Wachstum von *C. glutamicum* in Minimalmedium mit 50 mM Glukose und jeweils 50 mM einer α -Ketosäure sowie der Kontrolle nur auf 50 mM Glukose in Mikrotiterplatten

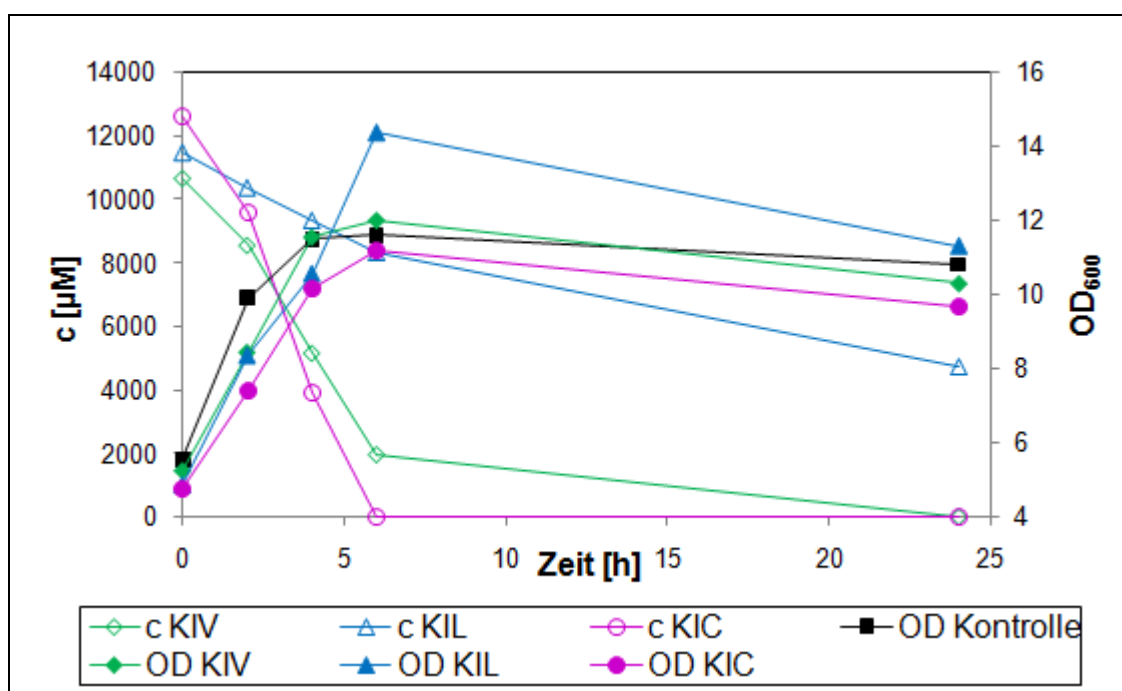


Abb. 6.1.2: Verbrauch der α -Ketosäuren und Wachstum von *C. glutamicum* in Minimalmedium mit 50 mM Glukose und jeweils 10 mM einer α -Ketosäure und als Kontrolle nur mit 50 mM Glukose in Schüttelkolben

Ergebnisse

In Abb. 6.1.2 ist das Wachstum von *C. glutamicum* und die Abnahme der jeweiligen α -Ketosäure graphisch dargestellt. Bei diesen hohen Zelldichten ($OD_{600} > 4$) war kaum mehr eine Wachstumsinhibition durch die α -Ketosäuren zu erkennen. Es konnte jedoch deutlich eine Abnahme der α -Ketosäuren im Medium gemessen werden. KIV und KIC waren nach 24 h Kultivierung komplett aufgebraucht. KIL hingegen wurde langsamer aufgenommen und war noch zu ca. 50% nach 24 h Kultivierung vorhanden.

Es konnte nun davon ausgegangen werden, dass die α -Ketosäuren von *C. glutamicum* aufgenommen wurden und sie durch einen internen Effekt die Wachstumsinhibition hervorriefen.

Um nun den Konzentrationsbereich der Wachstumsinhibition durch KIV und um die mögliche Wachstumsinhibition durch KIL und KIC bei niedrigeren Konzentrationen zu ermitteln, wurden Wachstumsversuche von *C. glutamicum* in Mikrotiterplatten auf ansteigenden Konzentrationen jeweils einer α -Ketosäure und 50 mM Glukose durchgeführt. Das Wachstum von *C. glutamicum* bei jeder Konzentration der α -Ketosäuren wurde in jeweils 3 parallelen Ansätzen beobachtet. Aus den gemessenen OD_{600} -Werten wurden die Zunahme der OD_{600} nach 20 h ermittelt, auf die Zunahme der Kontrolle (nur Glukose) bezogen und in Abb. 6.1.3 graphisch dargestellt. Für KIV konnte in dem Konzentrationsbereich von 10 μ M bis 50 mM nur eine geringe Abnahme der gebildeten Biomasse bei sehr hohen KIV Konzentrationen beobachtet werden. Für KIL hingegen war bereits bei 5 mM und für KIC sogar bei 1 mM eine Einschränkung des Wachstums zu vermerken. Bei 25 mM KIL und bei 50 mM KIC war kein Wachstum mehr feststellbar.

Die Wachstumsinhibition durch die α -Ketosäuren war konzentrationsabhängig. Wobei KIL und KIC schon bei deutlich niedrigeren Konzentrationen (1-5 mM) das Wachstum hemmten als KIV (25 mM).

Es war keine Kometabolisierung von Glukose und der jeweiligen α -Ketosäure zu erkennen, da auch bei nicht inhibierenden Konzentrationen der α -Ketosäuren keine höhere OD_{600} -Zunahme erreicht wurde als bei der Kontrolle nur auf Glukose.

Für alle weiteren Versuche mit externer Zugabe von α -Ketosäuren wurden daher neben den α -Ketosäuren auch immer 50 mM Glukose als C-Quelle dem Medium zugesetzt.

Es wurde beobachtet, dass eine erhöhte Konzentration einer BCAA zu einer 50%igen Inhibition der AHAS (acetohydroxy acid synthase) und dadurch zu einem Mangel der anderen beiden BCAA führte [Leyval *et al.* 2003].

Ergebnisse

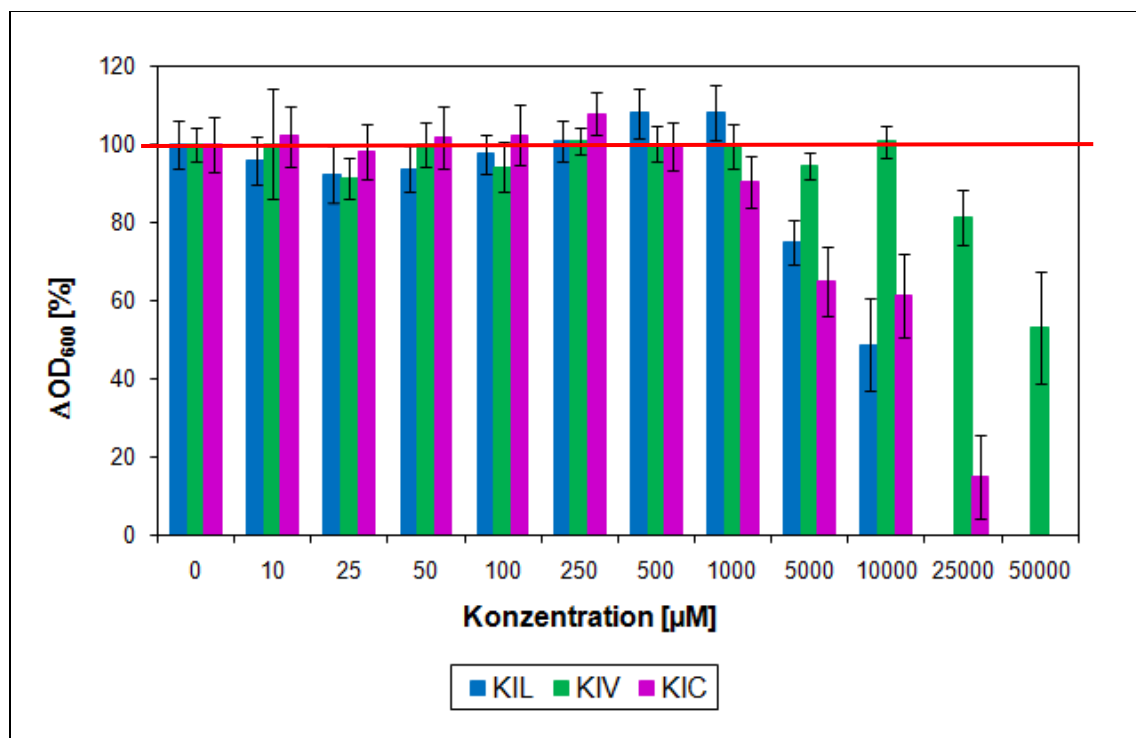


Abb. 6.1.3: Gemessene OD₆₀₀-Werte in Mikrotiterplatten von *C. glutamicum* auf Minimalmedium mit 50 mM Glukose und ansteigenden Konzentrationen jeweils einer α-Ketosäure, bezogen auf die OD₆₀₀-Zunahme der Kontrolle nur auf Glukose nach ca. 20 h Kultivierung

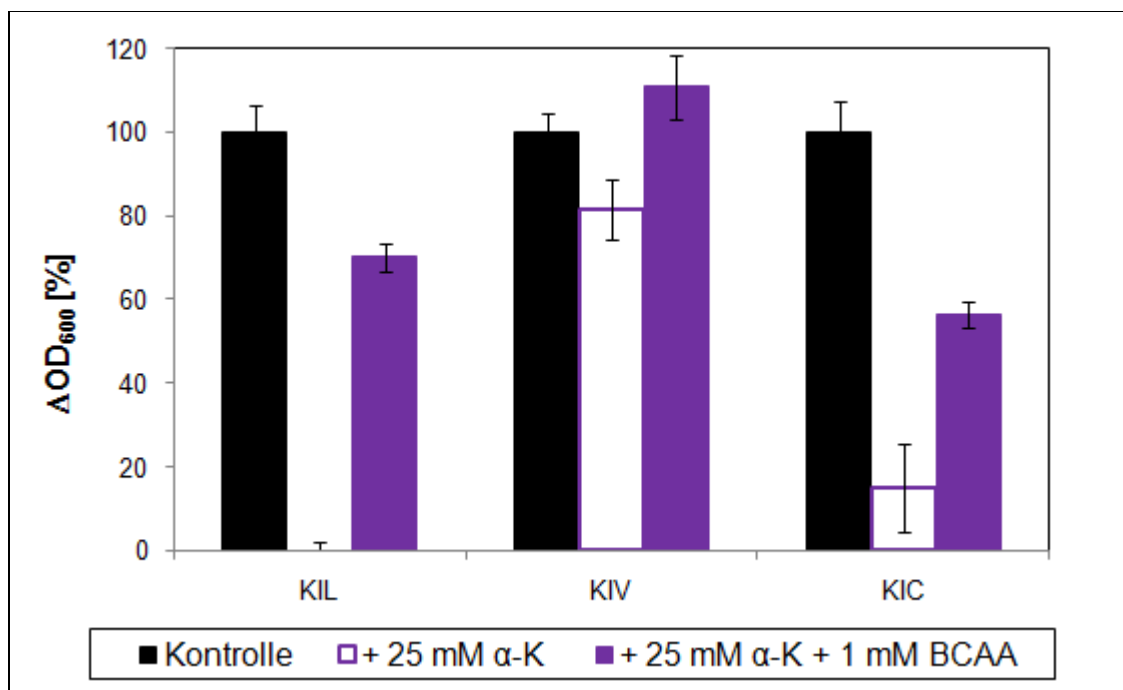


Abb. 6.1.4: Gemessene OD₆₀₀-Werte in Mikrotiterplatten von *C. glutamicum* in Minimalmedium mit 50 mM Glukose, 25 mM jeweils einer α-Ketosäure (α-K) und 1 mM BCAA, bezogen auf die OD₆₀₀-Zunahme der Kontrolle nur auf Glukose

Um zu testen, ob eine erhöhte Konzentration einer α -Ketosäuren auch einen Mangel der BCAA hervorrief, wurden Wachstumsversuche in Anwesenheit von 25 mM jeweils einer α -Ketosäure mit Zugabe von 1 mM BCAA durchgeführt (s. Abb. 6.1.4). Bei 25 mM war die Inhibition durch KIL oder KIC sehr deutlich. Bei 25 mM KIV hingegen war das Wachstum nur geringfügig eingeschränkt. Bei allen 3 α -Ketosäuren konnte durch die Zugabe von 1 mM BCAA das Wachstum deutlich verbessert werden.

Eine erhöhte Konzentration jeweils einer α -Ketosäure führte demnach zu einem Mangel der BCAA.

C. glutamicum zeigte häufig Unterschiede beim Wachstum in flüssigem Medium oder auf festem Medium. Dies wurde durch die unterschiedlichen Wachstumsbedingungen wie in flüssigem oder auf festem Medium begründet. In flüssigem Medium waren durch das Schütteln des Schüttelkolbens mit Schikanen eine bessere Durchmischung des Mediums und eine bessere Sauerstoffversorgung der Zellen gewährleistet. Um einen möglichen Wachstumsunterschied auf festem Medium mit α -Ketosäuren im Vergleich zu flüssigem Medium mit α -Ketosäuren zu ermitteln wurden durch Wachstumstests von *C. glutamicum* auf Gradientenplatten der α -Ketosäuren die inhibierenden Konzentrationen auf festem Medium ermittelt. In Abb. 6.1.5 A1-C1 sind die Gradientenplatten für jeweils eine α -Ketosäure mit dem entsprechenden Konzentrationsbereich und dem Bakterienrasen von *C. glutamicum* dargestellt. Die Wachstumsgrenze auf KIL und KIC auf festem Medium erreichte vergleichbare Konzentrationen wie in flüssigem Medium. Für KIV konnte keine eindeutige Aussage bezüglich der Sensitivität auf festem oder in flüssigem Medium getroffen werden, da bei flüssigem Medium die höchste verwendete Konzentration bei 50 mM lag und noch deutliches jedoch reduziertes Wachstum gegenüber der Kontrolle zu vermerken war. Auf festem Medium war das Wachstum ab ca. 70 mM KIV inhibiert.

Auf festem Medium wurde die Konzentration jeder α -Ketosäure ermittelt, ab welcher kein Wachstum von *C. glutamicum* mehr möglich war. Diese Konzentrationen konnten nun eingesetzt werden, um Mutanten von *C. glutamicum* nach putativen Importern für die α -Ketosäuren durch Wachstumsversuche auf Agarplatten mit den ermittelten Konzentrationen der α -Ketosäuren zu screenen.

Ergebnisse

Nach ca. 1,5 d konnte beobachtet werden, dass sich bei höheren Konzentrationen als die Grenze des Bakterienrasens Einzelkolonien von *C. glutamicum* bildeten. Dies war bei allen 3 α -Ketosäuren der Fall (s. Abb. 6.1.5 A2-C2). Es wurde vermutet, dass es sich dabei um Spontanmutanten handelte, die bei höheren Konzentrationen der α -Ketosäuren wachsen konnten.

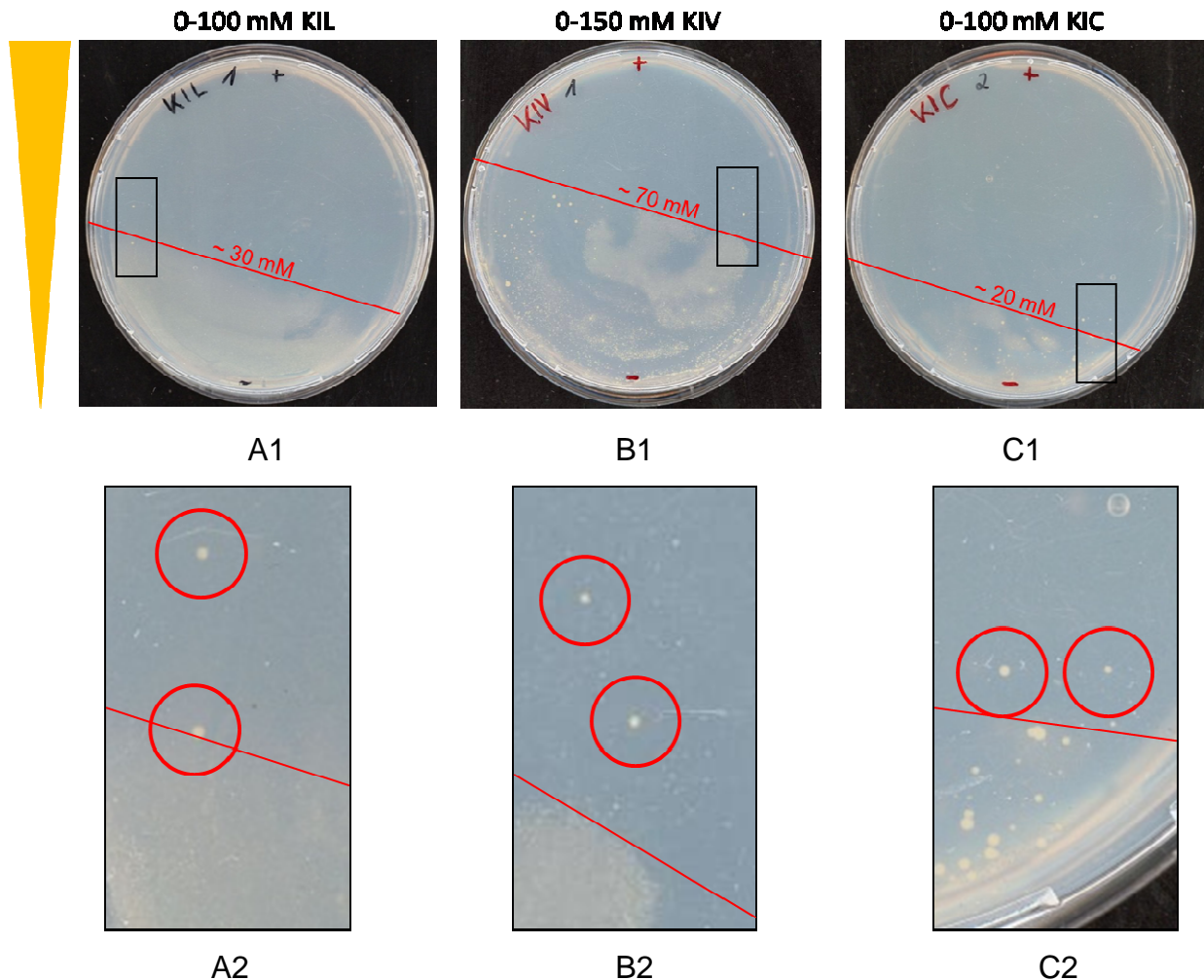


Abb. 6.1.5: Wachstum von *C. glutamicum* auf Gradientenplatten der α -Ketosäuren (A1: KIL 0-100 mM, B1: KIV 0-150 mM, C1: KIC 0-100 mM) mit Kennzeichnung der Wachstumsgrenze (---) und Markierung von Einzelkolonien (A2-C2: ○), die bei höheren Konzentrationen als *C. glutamicum* wachsen konnten und demnach Spontanmutanten darstellten. Die Richtung des Gradienten ist durch einen orangen Pfeil markiert.

Um zu überprüfen, ob die Mutationen stabil waren, wurden ca. 70 der Einzelkolonien auf Komplexmedium-Agarplatten kultiviert und anschließend zusammen mit *C. glutamicum* wieder auf Gradientenplatten der α -Ketosäuren, von der sie zuvor isoliert wurden, über den gesamten Gradienten ausgestrichen. Beispielhaft ist dafür eine 0-75 mM KIC-

Ergebnisse

Gradientenplatte, auf der Kulturen von Komplexmedium-Agarplatten der Spontanmutanten 1-10, die von KIC-Gradientenplatten isoliert worden waren, und von *C. glutamicum* aufgetragen wurden, in Abb. 6.1.6 dargestellt. Es wurden alle Spontanmutanten als stabil betrachtet, die bei höheren Konzentrationen der α -Ketosäuren im Vergleich zu *C. glutamicum* noch wachsen konnten. Dadurch konnte die Anzahl der Spontanmutanten auf 9 Spontanmutanten von KIL-, 21 Spontanmutanten von KIV- und 14 Spontanmutanten von KIC-Gradientenplatten eingegrenzt werden.

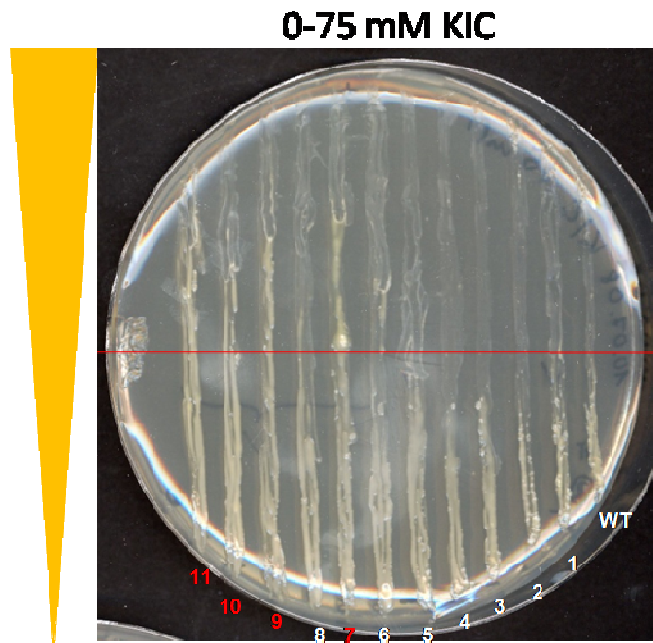
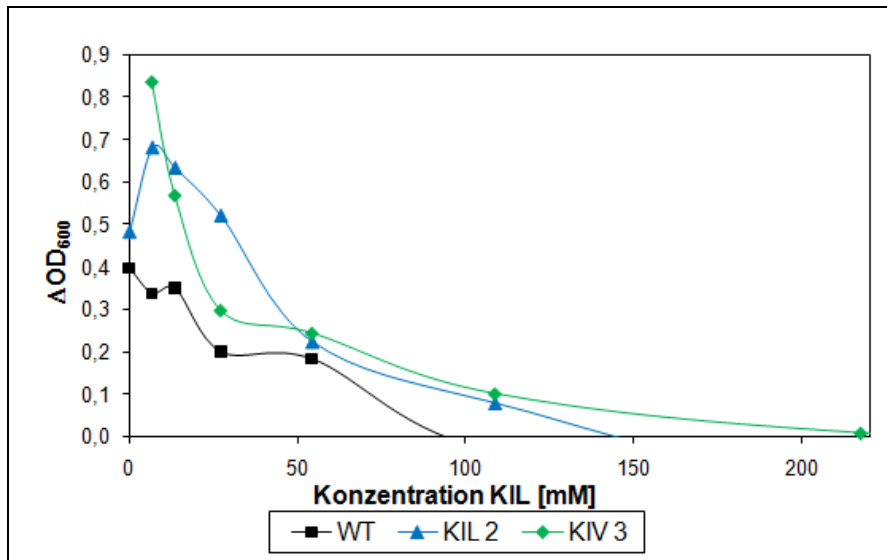


Abb. 6.1.6: KIC-Gradientenplatte mit Ausstrich über den gesamten Gradienten von Kulturen von 10 Spontanmutanten, die von einer KIC-Gradientenplatte isoliert worden waren, und *C. glutamicum*. Die Wachstumsgrenze des Wildtyps ist mit (--) gekennzeichnet. Alle rot unterlegten Spontanmutanten konnten bei höheren Konzentrationen von KIC wachsen und wurden als stabil betrachtet, da sie zuvor auf Komplexmedium ohne Selektionsdruck kultiviert worden waren.

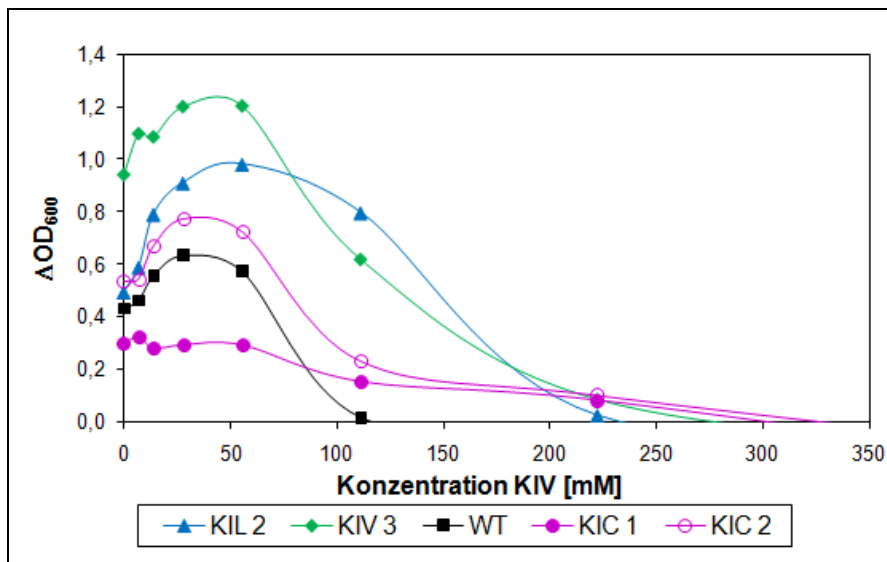
Zur näheren Untersuchung der Spontanmutanten und ebenso zur weiteren Reduktion der Anzahl wurde das Wachstum aller 44 Spontanmutanten in flüssigem Minimalmedium mit ansteigenden Konzentrationen der α -Ketosäuren in Mikrotiterplatten untersucht. Da es unklar war in wie weit die Mutationen der Spontanmutanten sich an unterschiedlichen Genloci ereignet hatten und demnach ob sich die Mutationen bezüglich ihrer Auswirkung unterschieden, wurde das Wachstum der Spontanmutanten unabhängig von der α -Ketosäure, von der sie isoliert wurden, in Anwesenheit von allen α -Ketosäuren beobachtet.

Ergebnisse

A



B



C

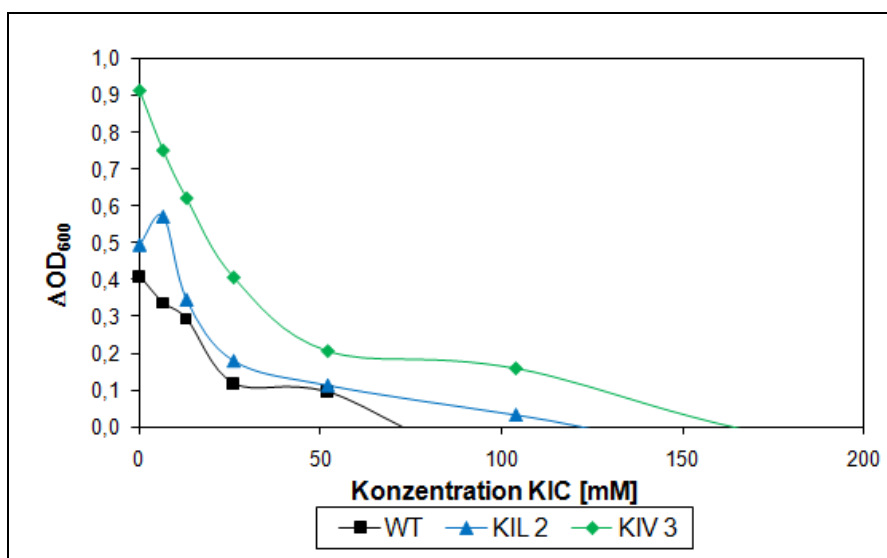


Abb. 6.1.7:

OD_{600} -Zunahme von *C. glutamicum* und den Spontanmutanten, die den größten Wachstumsunterschied zu *C. glutamicum* aufwiesen, mit ansteigenden Konzentrationen der α -Ketosäuren (A: KIL, B: KIV, C: KIC) in Mikrotiterplatten nach ca. 15 h.

Ergebnisse

In Abb. 6.1.7 A-C sind jeweils die Spontanmutanten, die den deutlichsten Unterschied im Wachstum im Vergleich zu *C. glutamicum* aufwiesen, beispielhaft neben dem Wildtyp graphisch dargestellt. Die α -Ketosäuren in der Benennung der Spontanmutanten gab an, von welcher α -Ketosäure sie isoliert wurden. Außer KIC1 beim Wachstum in Anwesenheit von KIV (A) zeigten alle dargestellten Spontanmutanten bei allen eingesetzten Konzentrationen der α -Ketosäuren eine höhere Zunahme der OD₆₀₀ im Vergleich zu *C. glutamicum*. Bei KIL und KIC war der Unterschied zum Wildtyp jedoch nicht so groß wie bei KIV. Es konnte jedoch bezüglich der Konzentrationsabhängigkeit und der Wachstumsinhibition ein vergleichbarer Trend zum Wildtyp festgestellt werden. KIC1 zeigte in Anwesenheit von KIV eine unterschiedliche Konzentrationsabhängigkeit des Wachstums. Bei niedrigen Konzentrationen von KIV war die Zunahme der OD₆₀₀ geringer als beim Wildtyp. Ab 100 mM KIV war jedoch vergleichbares Wachstum wie bei den anderen Spontanmutanten zu beobachten.

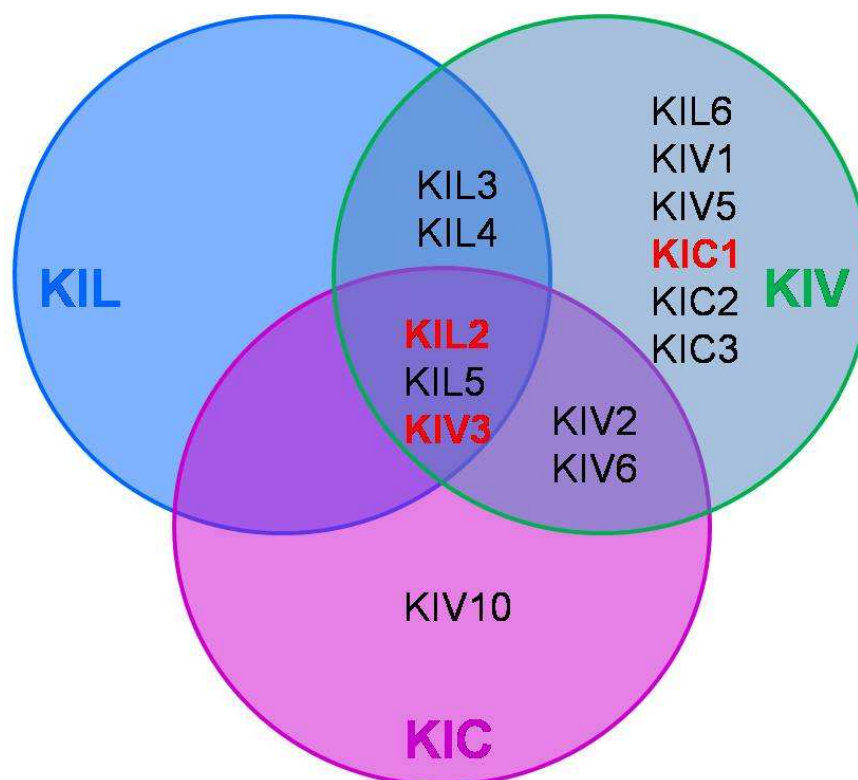


Abb. 6.1.8: Graphische Darstellung der Spontanmutanten, die auf den α -Ketosäuren entstanden waren und im Vergleich zu *C. glutamicum* ein unterschiedliches Wachstum in Mikrotiterplatten zeigten. Die Mutation wurde bei diesen Mutanten als stabil betrachtet. Die Spontanmutanten sind den α -Ketosäuren zugeordnet, auf denen sie ein unterschiedliches Wachstum aufwiesen. Die rot unterlegten Mutanten zeigten den größten Unterschied zum Wildtyp.

Ergebnisse

In Abb. 6.1.8 sind alle Spontanmutanten auf der α -Ketosäure dargestellt, bei der sie ein unterschiedliches Wachstum zum Wildtyp zeigten.

Durch diese Wachstumsversuche konnte die Anzahl der Spontanmutanten auf 14 Kandidaten reduziert werden.

Nach der einmaligen Durchführung des Screenings aller Spontanmutanten in Mikrotiterplatten, wurden die besten Kandidaten (s. Abb. 6.1.8, rot unterlegt), welche den größten Unterschied zum Wildtyp aufwiesen, in Schüttelkolben in Triplikaten weiter untersucht, um den Effekt bei höheren Biomassezunahmen zu beobachten. Es wurde nur das Wachstum in Anwesenheit von KIV untersucht, da bei KIV die größten Unterschiede zu *C. glutamicum* auftraten (s. Abb. 6.1.9). Die Mutante KIC1 zeigte jedoch keinen Unterschied zum Wachstum von *C. glutamicum*. Die Mutanten KIL2 und KIV3 zeigten im Konzentrationsbereich 50-100 mM eine etwas höhere Zunahme der OD_{600} . Bei den anderen Konzentrationen war kein Unterschied zum Wildtyp erkennbar.

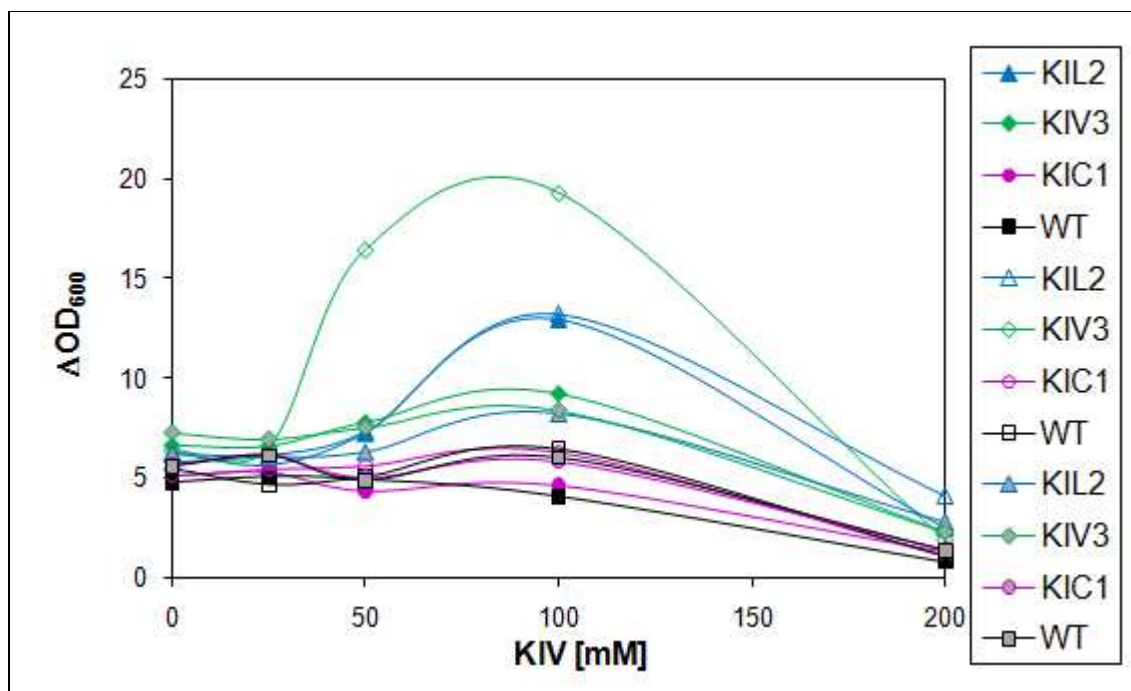


Abb.6.1.8: Wachstum von *C. glutamicum* und den Spontanmutanten KIC1, KIL2 und KIV3 mit ansteigenden Konzentrationen der α -Ketosäuren in Schüttelkolben nach ca. 23 h

Es konnte eine Kometabolisierung von Glukose und KIV bei 50 und 100 mM KIV beobachtet werden, da eine höhere OD_{600} -Zunahme im Gegensatz zum Wachstum nur auf Glukose zu beobachten war.

Ergebnisse

Bei diesen Spontanmutanten war demnach nicht der Transport sondern der Stoffwechsel der α -Ketosäuren durch die Mutation betroffen.

Die AHAS, welche durch die Gene *ilvB* und *ilvN* kodiert wird, bildet das Schlüsselenzym im Stoffwechsel der α -Ketosäuren und der BCAA [Elišáková *et al.* 2005]. Daher wurde in den Spontanmutanten KIL2 und KIV3 das Operon *ilvBNC* sequenziert und mit der Sequenz von *C. glutamicum* verglichen. Es konnte jedoch keine Mutation innerhalb dieser Gene in den Spontanmutanten gefunden werden. Die Mutation musste demnach in einem anderen Gen liegen

6.2 Wachstumsinhibition von *E. coli* durch α -Ketosäuren

In *E. coli* ist der Stoffwechsel der BCAA sehr gut untersucht. Es war jedoch nicht bekannt, ob die α -Ketosäuren auch inhibierend auf das Wachstum von *E. coli* wirken würden wie bei *C. glutamicum*. Daher wurden Wachstumsversuche von *E. coli* MG1655 auf 50 mM Glukose und mit ansteigenden Konzentrationen der α -Ketosäuren in Mikrotiterplatten durchgeführt. Es wurden wieder 3 parallele Ansätze pro Konzentration einer α -Ketosäure beobachtet. Im Gegensatz zu *C. glutamicum* reagierte *E. coli* viel sensibler auf die α -Ketosäuren (s. Abb. 6.2.1).

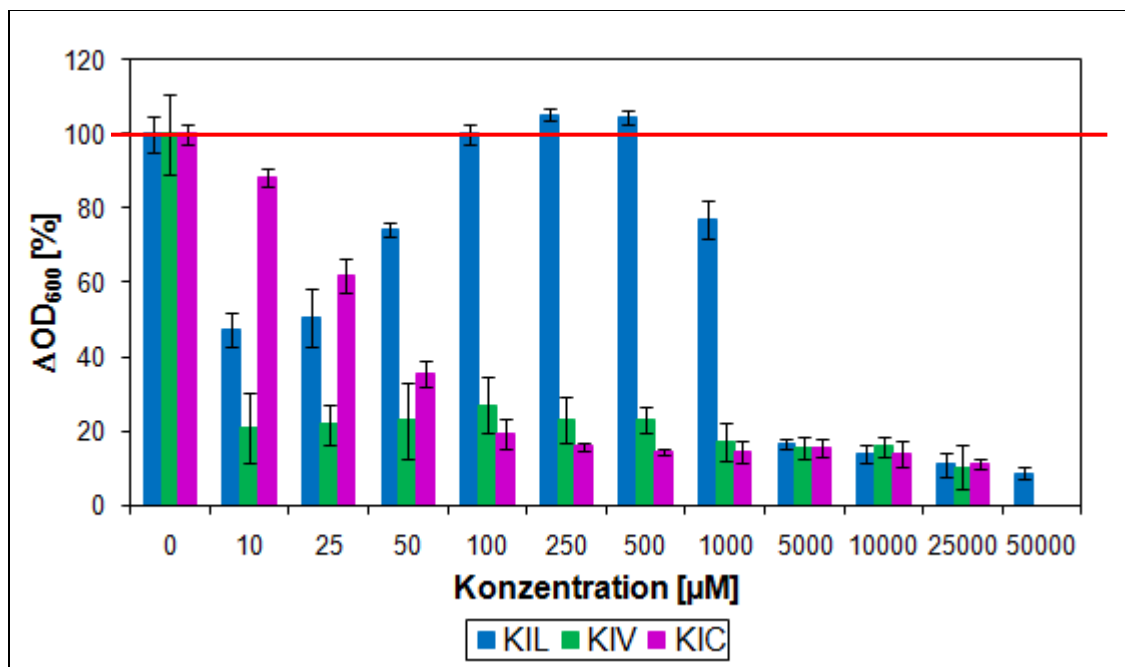


Abb. 6.2.1: Gemessene OD_{600} -Werte in Mikrotiterplatten von *E. coli* MG1655 auf Minimalmedium mit 50 mM Glukose und mit ansteigenden Konzentrationen jeweils einer α -Ketosäure, bezogen auf die OD_{600} -Zunahme der Kontrolle nur auf Glukose

Bei KIC konnte eine Abnahme des Wachstums mit ansteigender Konzentration der α -Ketosäure beobachtet werden. Dies geschah bereits bei 10 μ M KIC. Ab 100 μ M KIC waren nur noch weniger als 20% Wachstum vorhanden. Bei KIV war das Wachstum bereits ab 10 μ M auf unter 30% reduziert. Bei KIL konnte ab 10 μ M eine Reduktion und dann ein Anstieg der Konzentrationsabhängigkeit des Wachstums beobachtet werden. Bei 10 μ M KIL war das Wachstum auf ca. 50 % reduziert. Bis 500 μ M stieg die OD₆₀₀-Zunahme wieder an, bis der ursprüngliche Wert der Kontrolle wieder erreicht war. Anschließend war wieder eine Abnahme des Wachstums zu beobachten. Ab 5 mM KIL war kaum mehr Wachstum vorhanden.

Da auch *E. coli* ein durch die α -Ketosäuren inhibiertes Wachstum zeigte, wurde geschlussfolgert, dass *E. coli* ebenso wie *C. glutamicum* zur Aufnahme der α -Ketosäuren fähig war.

6.3 Charakterisierung des Imports der α -Ketosäuren in *C. glutamicum*

Nach Wachstumstests und Verbrauchsstudien konnte gezeigt werden, dass die α -Ketosäuren von *C. glutamicum* aufgenommen wurden. Es stellte sich nun die Frage welcher Transporter für die Aufnahme verantwortlich war.

6.3.1 Untersuchung des Import der α -Ketosäuren über BrnQ

Es wurde gezeigt, dass in *C. glutamicum* [Tauch *et al.* 1998] die verzweigtkettigen Aminosäuren genauso wie bei *E. coli* [Guardiola *et al.* 1974] über den Kationen-Symporter BrnQ aufgenommen werden. Es stellte sich demnach die Frage, ob auch die α -Ketosäuren der BCAA über diesen Importer aufgenommen werden.

Es wurden Aufnahmemessungen von ¹⁴C-markiertem Isoleucin (Ile) in Anwesenheit der α -Ketosäuren durchgeführt, um die Beteiligung von BrnQ am Import der α -Ketosäuren zu klären (s. Abb. 6.3.1.1). Aufnahmemessungen von ¹⁴C-markierten α -Ketosäuren konnten nicht durchgeführt werden, da diese kommerziell nicht erhältlich sind. Im Falle einer Aufnahme der α -Ketosäuren über BrnQ sollte die Aufnahme von ¹⁴C-markiertem Ile in Anwesenheit eines Überschusses an α -Ketosäuren deutlich reduziert werden. Dies konnte jedoch nicht beobachtet werden.

Bei der eingesetzten Konzentration der α -Ketosäuren (5 mM) war BrnQ nicht signifikant am Import der α -Ketosäuren beteiligt.

Ergebnisse

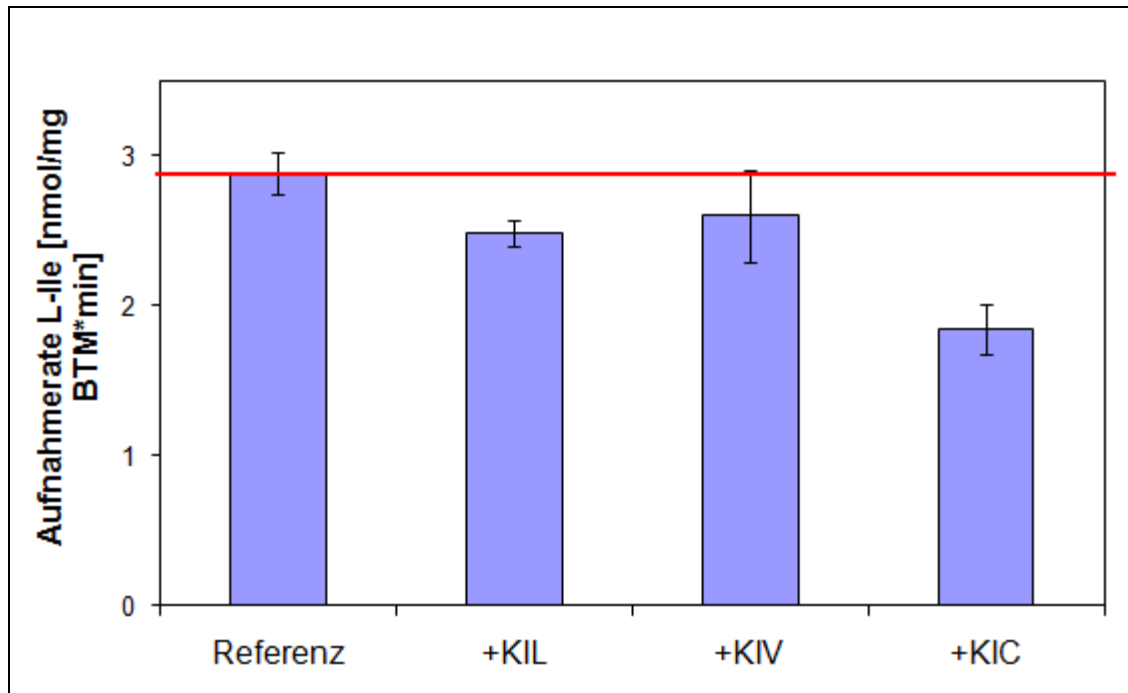


Abb. 6.3.1.1: Aufnahmemessung von ^{14}C -Ile in *C. glutamicum* ohne (Referenz) und in Anwesenheit eines 100-fachen Überschuss der α -Ketosäuren im V_{\max} Bereich für Ile (50 μM)

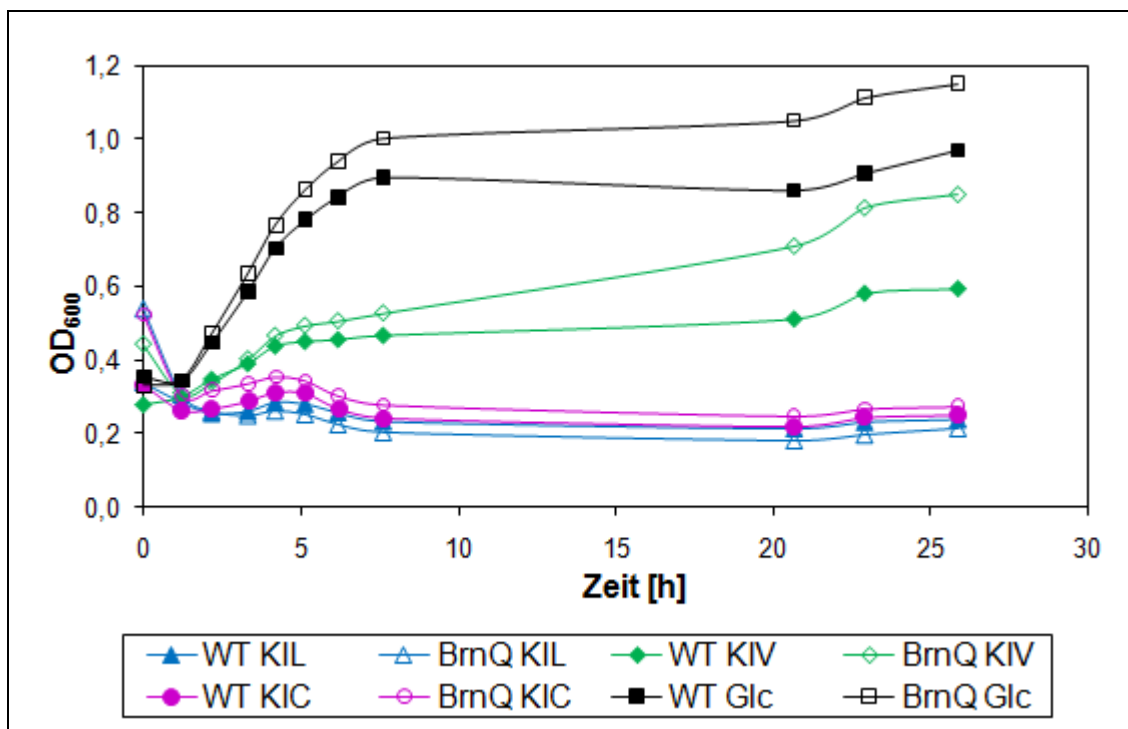


Abb. 6.3.1.2: Wachstum in Mikrotiterplatten von *C. glutamicum* und *C. glutamicum* $::brnQ$ auf Minimalmedium mit 50 mM Glukose und jeweils 50 mM einer α -Ketosäure sowie der Kontrolle nur auf 50 mM Glukose

Um zu testen, ob BrnQ bei höheren α -Ketosäure Konzentrationen am Import beteiligt war, wurden Wachstumsversuche von *C. glutamicum* und *C. glutamicum* ::*brnQ* auf 50 mM Glukose und mit jeweils 50 mM einer α -Ketosäure in Mikrotiterplatte durchgeführt. Würden die α -Ketosäuren über BrnQ aufgenommen werden, sollte die Anwesenheit jeweils einer α -Ketosäure im Medium keinen Einfluss auf das Wachstum einer *brnQ*-Insertionsmutante haben. Dieser Effekt konnte bei der *brnQ*-Insertionsmutante jedoch nicht beobachtet werden. Es zeigte sich eine Wachstumsinhibition durch die α -Ketosäuren, die vergleichbar war zum Effekt auf *C. glutamicum* (s. Abb. 6.3.1.2).

Demnach war BrnQ nicht am Import der α -Ketosäuren beteiligt.

Um nun nach Importern für die α -Ketosäuren zu suchen, wurden unterschiedliche Ansätze gewählt. Diese Ansätze konnten jedoch nur erfolgreich sein, wenn die α -Ketosäuren über einen einzigen Transporter oder über ein Hauptaufnahmesystem pro α -Ketosäure aufgenommen werden.

6.3.2 Screening nach Importern der α -Ketosäuren durch gerichtete Mutagenese

Zuerst wurde eine Mutantenbank, die durch gerichtete Mutagenese in der Arbeitsgruppe erstellt wurde und in der ca. 100 der 400 putativen Transporter in *C. glutamicum* durch Insertion deaktiviert wurden, auf Wachstum in Anwesenheit von inhibierenden Konzentrationen der α -Ketosäuren untersucht. Sollte ein Importer deaktiviert worden sein, müsste diese Mutante besser in Anwesenheit der α -Ketosäuren wachsen können. Es wurden alle 3 α -Ketosäuren verwendet, da nicht bekannt war, ob die α -Ketosäuren alle über einen Transporter oder über unterschiedliche Transporter aufgenommen werden. Das Screening wurde in Mikrotiterplatten durchgeführt. Die Konzentrationen der α -Ketosäuren wurden so eingestellt, dass eine 50-100%ige Wachstumsinhibition von *C. glutamicum* vorhanden sein sollte. Für KIL wurden 10-25 mM, für KIV 50-200 mM und für KIC 10-50 mM eingesetzt. Zusätzlich wurde jede Mutante auf Minimalmedium angezogen um auszuschließen, dass schon auf Minimalmedium ein Wachstumsdefizit bestand. Für jede Mutante wurde pro Konzentration die Wachstumsrate ermittelt, die End-OD₆₀₀ nach 7 h und die Zunahme der OD₆₀₀ nach 7 h. Eine Mutante wurde als Kandidat betrachtet, wenn bei mindestens 3 Konzentrationen ein besseres Wachstum als bei *C. glutamicum* vorlag. In Tab. 6.3.2.1 sind alle Kandidaten aufgelistet, die bei mindestens 2 Parametern (A: μ , B: OD₆₀₀ 7h, C: Δ OD₆₀₀ 7h) besser waren als der

Ergebnisse

Wildtyp bezogen auf die jeweilige α -Ketosäure. Es wurde ebenfalls aufgelistet, ob nachfolgende Gene eines Operons durch die Insertion betroffen sein könnten.

Tab. 6.3.2.1: Kandidaten des Screenings der Arbeitsgruppen-internen Mutantenbank, die in Anwesenheit von inhibierenden Konzentrationen der α -Ketosäuren ein besseres Wachstum als *C. glutamicum* zeigten. Die Parameter sind gekennzeichnet durch welche die einzelnen Kandidaten auffällig wurden. (A: μ , B: OD₆₀₀ 7 h, C: Δ OD₆₀₀ 7h)

Mutante cgl-Nr.	KIL			KIV			KIC			vorhergesagte Funktion	Beeinflussung von putativem Operon	vorhergesagte Funktion
	A	B	C	A	B	C	A	B	C			
0067		x	x					x	x	Citrate transporter	cgl0066	Hypothetical membrane protein
0092				x		x				Hypothetical membrane protein	cgl0091	Predicted hydrolases or acyltransferases (alpha/beta hydrolase superfamily)
0101	x	x						x	x	P-aminobenzoyl-glutamate transporter	cgl0102	Metal-dependent amidase/aminoacylase/carboxypeptidase
0225	x	x					x	x		Di- and tricarboxylate transporter		
0267	x	x	x							Formate hydrogenlyase subunit 3/Multisubunit Na ⁺ /H ⁺ antiporter, MnhD subunit	cgl0264-0266	Hypothetical membrane protein
0590							x		x	Predicted permease	cgl0591	Predicted hydrolases or acyltransferases (alpha/beta hydrolase superfamily)
1005								x	x	Na ⁺ /proline, Na ⁺ /panthothenate symporters and related permeases	cgl1004	Uncharacterized proteins, homologs of lactam utilization protein B
1082				x	x	x	x		x	Ca ²⁺ /H ⁺ antiporter	cgl1083	Uncharacterized proteins, LmbE homologs
1107								x	x	Gamma-aminobutyrate permease and related permeases or aromatic amino acid permease	cgl1106	Tetrahydrodipicolinate N-succinyltransferase
1163								x	x	PutP	cgl1161,1162	Hypothetical membrane protein
1502	x	x	x					x	x	Permeases of the major facilitator superfamily		
2327	x	x	x		x	x				Predicted Na ⁺ -dependent transporter		
2551	x	x	x				x	x	x	Na ⁺ /H ⁺ -dicarboxylate symporters	cgl2550	Hypothetical membrane protein
2731	x		x							Formate hydrogenlyase subunit 3/Multisubunit Na ⁺ /H ⁺ antiporter, MnhD subunit	cgl2732-2734	Multisubunit Na ⁺ /H ⁺ antiporter
3083	x		x							AzID	cgl3082	Hypothetical membrane protein

Ergebnisse

Bei KIL oder KIC zeigten ca. 10% der untersuchten Mutanten bezogen auf 2 oder mehr Parameter ein besseres Wachstum als *C. glutamicum*. Bei KIV waren es 3% der untersuchten Mutanten. Cgl1082 zeigte für KIV bezogen auf alle 3 Parameter besseres Wachstum als *C. glutamicum* und wurde daher als vielversprechendster Kandidat angesehen. Für KIL und KIC zeigte Cgl2551 ein vergleichbares Wachstum. Zusätzlich waren noch Cgl0267, Cgl1502 und Cgl2327 Kandidaten für den Import von KIL. Unter den besten Kandidaten waren bei allen drei α -Ketosäuren keine bereits bekannten Transporter. Für Cgl2551 wurde schon die Stoffgruppe der Dicarboxylate als Substrat vorgeschlagen. Bei den anderen Kandidaten wurde jeweils nur das Cosubstrat vorhergesagt und teilweise ob diese im Symport oder Antiport transportiert werden. Auch in der genetischen Umgebung waren durch die Organisation in einem putativen Operon nur hypothetische Membranproteine betroffen.

Das Screening der Mutantenbank lieferte für alle drei α -Ketosäuren 1-3% vielversprechende Kandidaten für den Import. Diese Anzahl ist geeignet um die Kandidaten in nachfolgenden Experimenten, wie z.B. Wachstumstest in Schüttelkolben, weiter zu untersuchen.

6.3.3 Screening nach Importern der α -Ketosäuren durch ungerichtete Mutagenese

Eine andere Möglichkeit nach Importern der α -Ketosäuren zu suchen, stellte das Screening einer Transposonbank von *C. glutamicum*, die durch ungerichtete Mutagenese in der Arbeitsgruppe Kalinowski der Uni Bielefeld erstellt worden war, dar. Auch diese Methode konnte nur erfolgreich sein, wenn es nur einen Importer oder ein Hauptimportsystem für die α -Ketosäuren gibt. Eine Kultivierung in flüssigem Medium war bei der hohen Anzahl an Mikrotiterplatten (110 Platten pro α -Ketosäure) nicht möglich, da es nur eine begrenzte Anzahl an Schüttelplätzen für die Mikrotiterplatten gab. Deshalb wurden die Bedingungen ermittelt um das Screening auf Agarplatten durchzuführen. Dabei sollte untersucht werden, welche Parameter eine größtmögliche Automatisierung des Screenings erlaubten. Mit 96 ausgewählten Mutanten aus der Transposonbank wurde getestet, bei welchen Konzentrationen der α -Ketosäuren noch maximal 1-2 Mutanten wachsen konnten. Zusätzlich wurde untersucht, ob das Animpfen der Agarplatten mit einem Replikator möglich wäre. Desweiteren wurde getestet, ob eine Vorkultivierung auf Minimalmedium notwendig sei oder ob eine Vorkultivierung auf Komplexmedium ausreichen würde. Zuerst wurde untersucht, ob das Animpfen mit Hilfe

Ergebnisse

eines Replikators möglich war. Als Vergleich wurden jeweils 5 μ L der Kulturen mit einer Pipette aufgetropft.

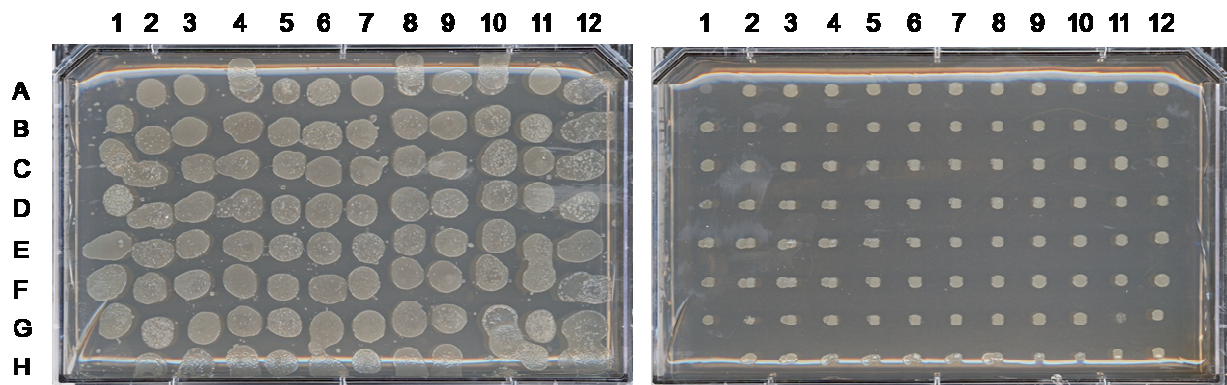


Abb. 6.3.3.1: Wachstum von 96 ausgewählten Mutanten der Transposonbank nach Anwendung unterschiedlicher Animpfmöglichkeiten (links: 5 μ L Kultur mit Pipette, rechts: mit 96-fachem Replikator) für Agarplatten mit Kulturen aus 96-well Mikrotiteplatten

Auf beiden Minimalmedium-Agarplatten (s. Abb. 6.3.3.1) war vergleichbares Wachstum der Kulturen zu beobachten. Anschließend wurde untersucht, ob dies auch in Anwesenheit der α -Ketosäuren der Fall wäre. Dabei wurde ebenso ermittelt, welche Konzentrationen der α -Ketosäuren notwendig waren. Auch bei Anwesenheit der α -Ketosäuren war das Wachstum der Kulturen mit beiden Animpftechniken vergleichbar. Es konnte für alle 3 α -Ketosäuren die geeignete Konzentration ermittelt werden, bei der das Wachstum von Maximal 1-2 Mutanten noch zu beobachten war. Für KIV lag diese bei 125 mM (s. Abb. 6.3.3.2), für KIL bei 60 mM und für KIC bei 75 mM.

Ergebnisse

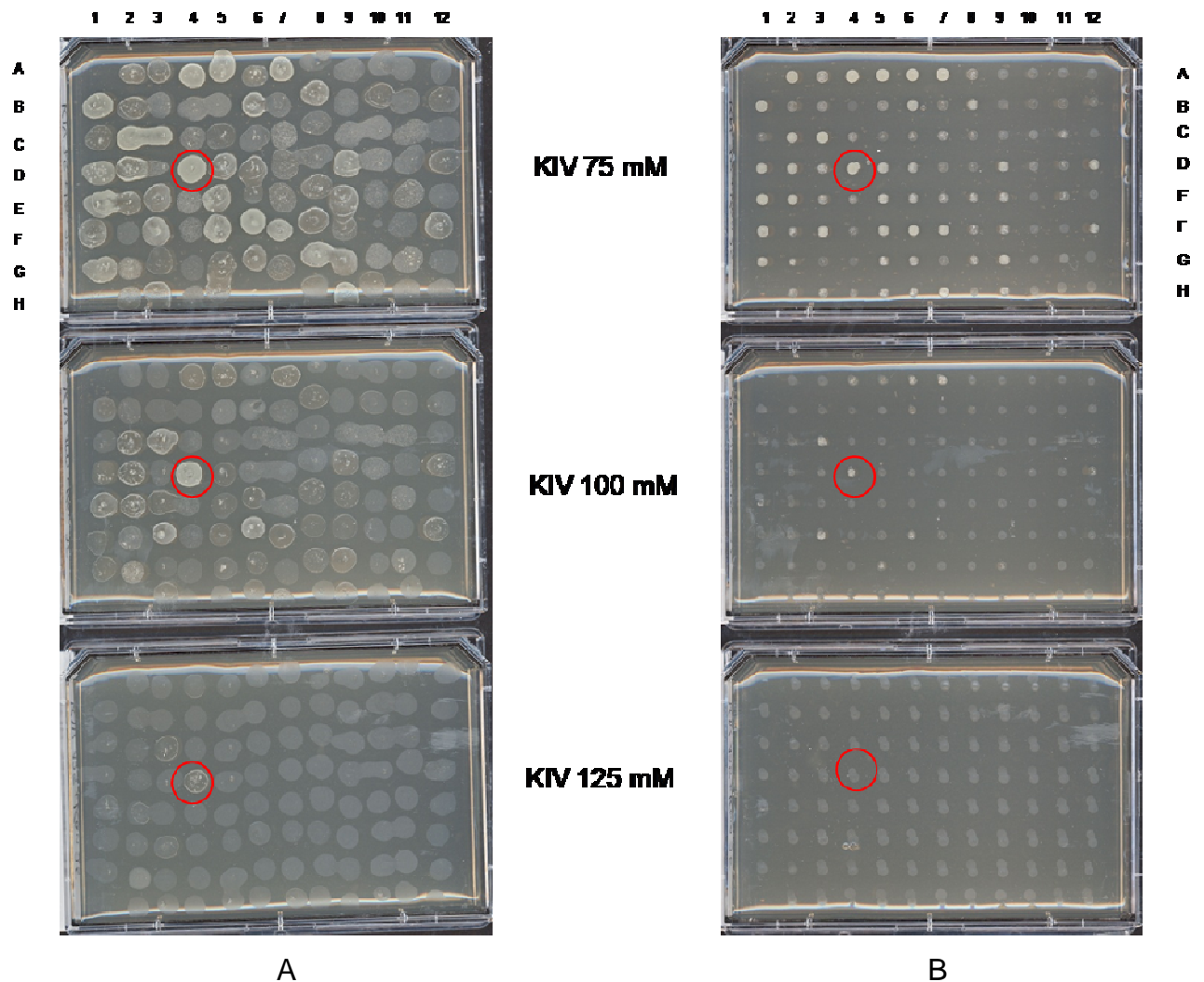


Abb. 6.3.3.2: Wachstum von 96 ausgewählten Mutanten der Transposonbank nach Anwendung unterschiedlicher Animpfmöglichkeiten (A: 5 μ L Kultur mit Pipette, B: mit 96-fachem Replikator) für Agarplatten mit Kulturen aus 96-well Mikrotiteplatten und zusätzliche Bestimmung der KIV-Konzentration, bei der noch maximal 1-2 Mutanten wachsen konnten

Schließlich wurde noch untersucht, ob eine Vorkultivierung nur auf Komplexmedium einen negativen Einfluss auf das Screening haben würde und demnach eine 2. Vorkultivierung auf Minimalmedium notwendig wäre. In Abb. 6.3.3.3 ist das Screening der ausgewählten Mutanten auf der ermittelten Konzentration an KIV nach Vorkultivierung auf Komplexmedium oder auf Komplex- und Minimalmedium dargestellt. Es zeigt sich, dass bei Vorkultivierung auf Komplexmedium die Konzentration an KIV nicht ausreichend war, um das Wachstum von nur 1-2 Mutanten zu gewährleisten. Bei nachfolgender Kultivierung auf Minimalmedium war dies jedoch der Fall.

Ergebnisse

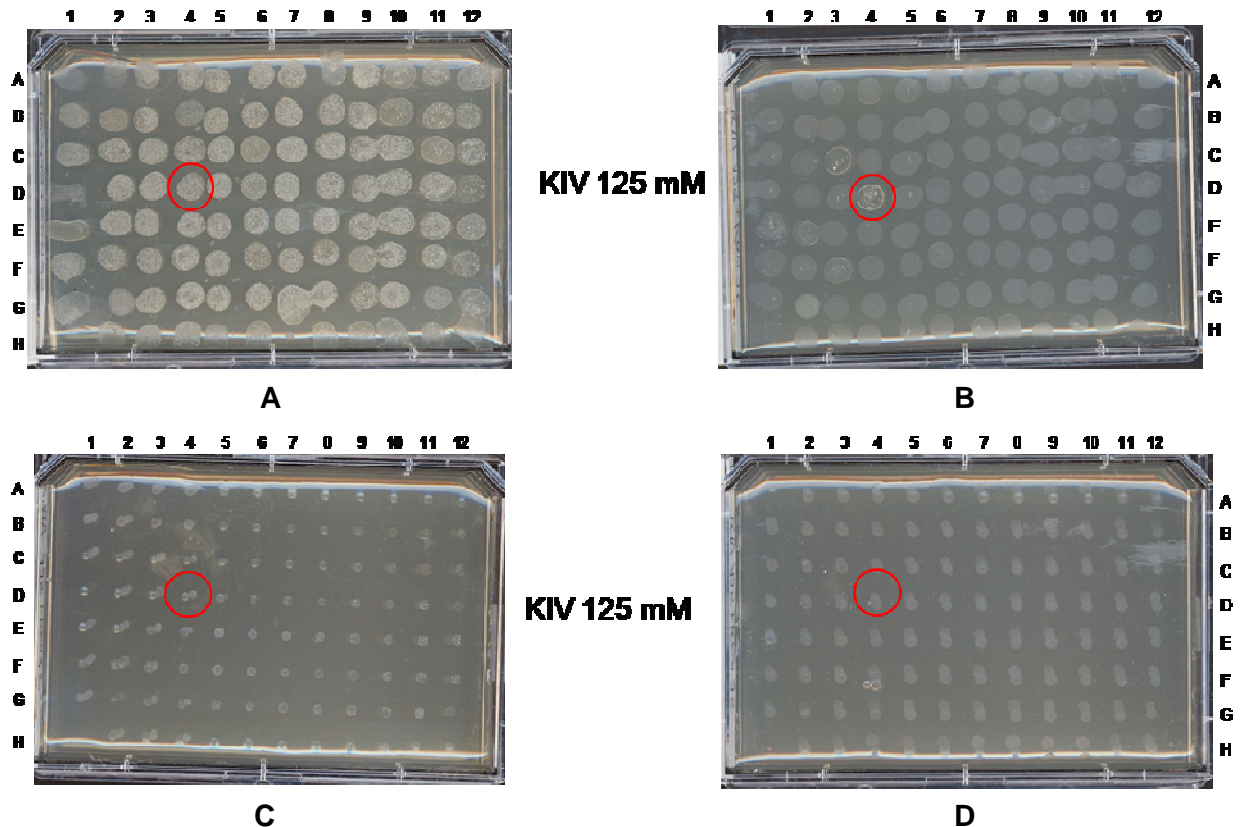


Abb. 6.3.3.3: Untersuchung der Vorkultivierung nur auf Komplexmedium (A und C) oder auf Komplex- und nachfolgend auf Minimalmedium (B und D) der Transposon-Testplatte und Transfer auf die Screeningplatte mit beiden Animpfmöglichkeiten (A und B: Pipette, C und D: Replikator)

Es konnte gezeigt werden, dass das Animpfen der Agarplatte mit dem Replikator möglich war. Die für das Screening notwendigen Konzentrationen der α -Ketosäuren wurden ebenfalls ermittelt (KIV: 125 mM; KIL: 60 mM; KIC: 75 mM). Diese Konzentrationen konnten jedoch nur verwendet werden, wenn eine Vorkultivierung der Mutanten auf Komplex- und nachfolgend auf Minimalmedium durchgeführt wurde.

Diese Parameter wurden an einen Kooperationspartner übermittelt, welcher dann das Screening durchführte. Bei diesem Screening konnten jedoch keine Mutanten identifiziert werden, bei denen ein transporterkodierendes Gen durch die Mutation betroffen war.

6.4 Charakterisierung des Exports der α -Ketosäuren in *C. glutamicum*

Der Export spielt eine bedeutende Rolle für die Produktion eines Stoffwechselprodukts. Durch Export des Produkts wird das Gleichgewicht innerhalb der Zelle in Richtung des Produktes verschoben und demnach mehr produziert. Ein exkretiertes Produkt kann zusätzlich leichter von den Zellen abgetrennt werden. Im Falle der Produktion der BCAA ist jedoch auch der Export der α -Ketosäuren wichtig, da exkretierte α -Ketosäuren nicht mehr in die entsprechende BCAA umgewandelt werden können und eine Reduktion der Ausbeute auftritt.

6.4.1 Stammhintergründe zur Anreicherung der α -Ketosäuren

In *C. glutamicum* konnte kein Export der α -Ketosäuren gemessen werden, da die internen α -Ketosäuren direkt in die entsprechenden BCAA umgewandelt wurden. Deshalb wurde zuerst ein Stammhintergrund entwickelt, in dem eine Produktion von jeweils einer α -Ketosäure möglich war. Für KIV konnte dies mit der Deaktivierung der Pyruvatdehydrogenase ($\Delta aceE$) und der BCAA-Transaminase ($\Delta ilvE$) erreicht werden. Die Deaktivierung der Pyruvatdehydrogenase war notwendig, um den C-Fluss nicht in Richtung des TCA-Zyklus sondern in Richtung der α -Ketosäuren zu leiten. Der Stamm wurde dadurch auxotroph für Acetat und die BCAA. Dieser Stammhintergrund wurde von der Arbeitsgruppe Eikmanns der Uni Ulm entwickelt. Nach 24 h Kultivierung konnte eine externe KIV-Konzentration von 2-5 mM erreicht werden. Während der Messung wuchs der Stamm *C. glutamicum* $\Delta aceE$ $\Delta ilvE$ nur noch geringfügig, da das Medium kein Acetat enthielt. Die KIV-Produktion fand demnach in der stationären Phase statt. Die spezifische externe KIV-Konzentration stieg innerhalb der untersuchten 3 h linear an (s. Abb. 6.4.1.1), daher konnte auch eine Exportrate gemessen werden. Die tatsächliche Exportrate konnte nicht bestimmt werden, da in diesem Stammhintergrund neben dem Export auch noch der Import von KIV aktiv war. KIL und KIC konnten extern nur in sehr geringen Konzentrationen nachgewiesen werden.

Dieser Stammhintergrund war demnach geeignet den KIV-Export zu untersuchen und wurde in den nachfolgenden Versuchen als KIV-Referenzstamm bezeichnet.

Auch für die Produktion von KIL und KIC wurde ein Stammhintergrund entwickelt [AG Eikmanns, Uni Ulm]. Dabei wurden *ltbR*, welches einen Repressor für die Gene *leuC/D* und *leuB* kodiert, und *ilvE* deletiert. Der Stamm war dadurch auxotroph für die BCAA.

Ergebnisse

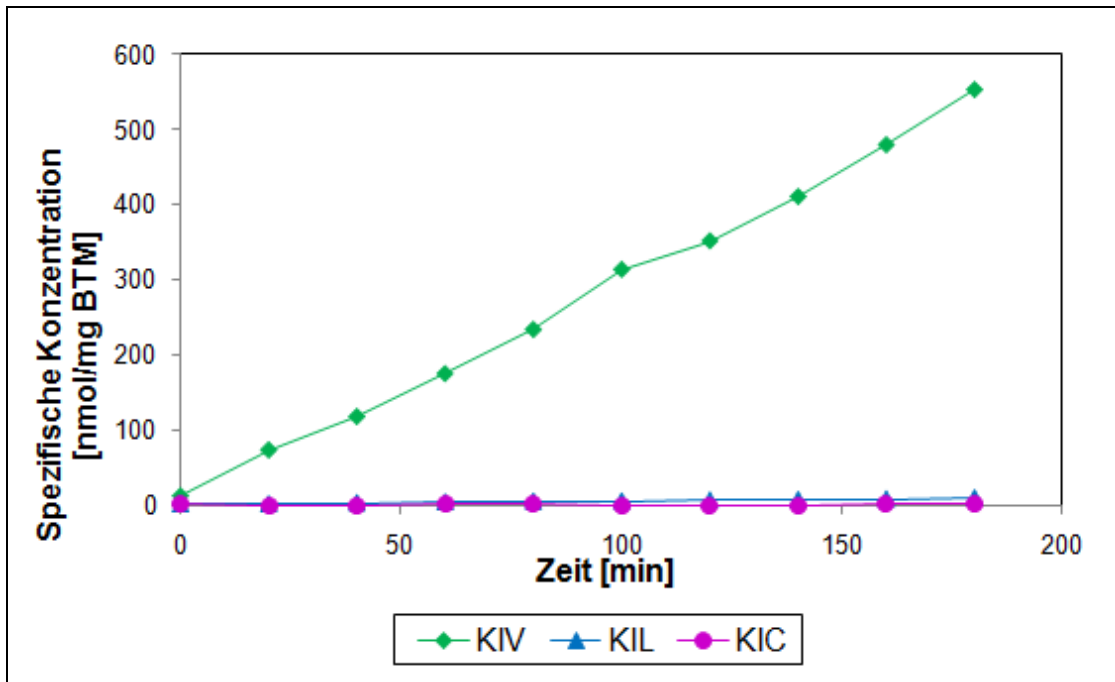


Abb. 6.4.1.1 Spezifische externe Konzentrationen der α -Ketosäuren im $\Delta aceE \Delta ilvE$ -Hintergrund

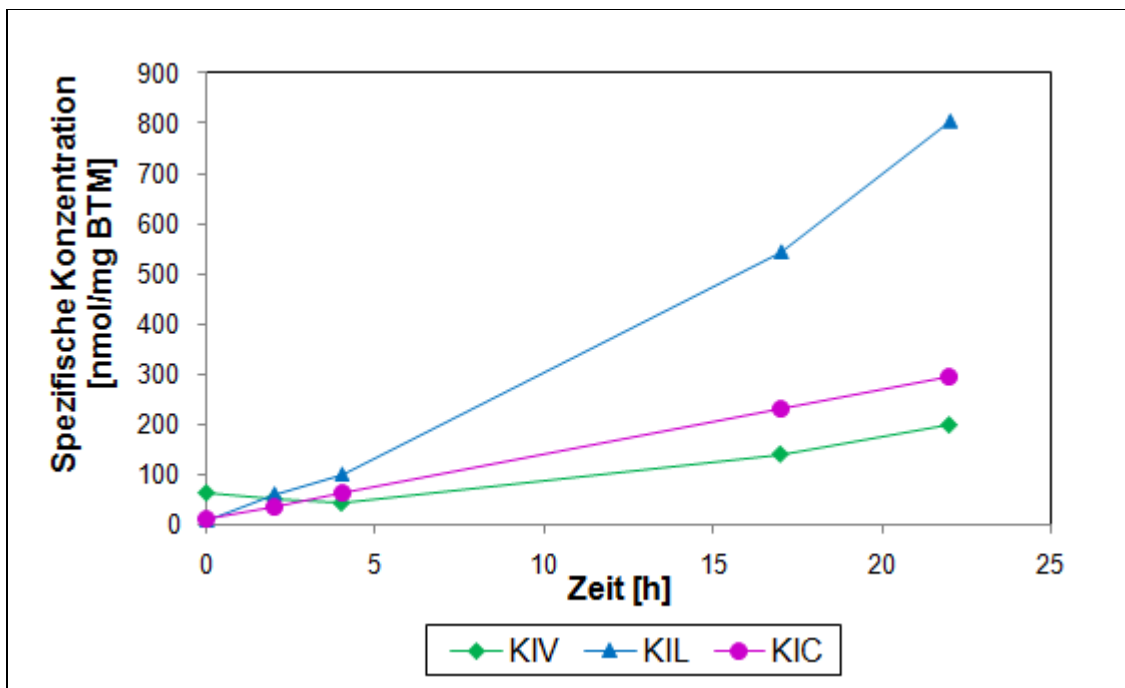


Abb. 6.4.1.2: Spezifische externe Konzentrationen der α -Ketosäuren im $\Delta ltbR \Delta ilvE$ -Hintergrund

In diesem Stammhintergrund wurden beide α -Ketosäuren gleichzeitig produziert, wobei nach 24 h Kultivierung ca. 8-10 mM KIL und 2-3 mM KIC extern vorlagen. Es konnte auch KIV extern nachgewiesen werden, jedoch in deutlich niedrigeren Konzentrationen als im $\Delta aceE \Delta ilvE$ -Hintergrund. Obwohl in dem Medium während der Messung keine

Ergebnisse

BCAA enthalten waren, konnte der Stamm *C. glutamicum* $\Delta ltbR \Delta ilvE$ noch sehr gut wachsen (OD_{600} nach 24 h: 25-30). Um also ähnliche spezifische Konzentrationen bezogen auf die Biomasse an KIL zu erreichen wie für KIV im $\Delta aceE \Delta ilvE$ -Hintergrund (ca. 600 nmol/mg BTM nach 3 h) musste die Messung auf ca. 18-20 h erweitert werden. Für KIC lag nach dieser Messzeit eine spezifische Konzentration von nur 200 nmol/mg BTM vor.

Im $\Delta ltbR \Delta ilvE$ -Hintergrund konnte der Export von KIL und KIC beobachtet werden. Im Vergleich zum $\Delta aceE \Delta ilvE$ -Hintergrund musste die Messzeit jedoch von 3 auf 20 h angehoben werden.

6.4.2 Untersuchung des Exports von KIV über BrnFE

Neben BrnQ war auch der Exporter für die BCAA bekannt [Kennerknecht et al. 2002]. Es sollte nun getestet werden, ob auch KIV über BrnFE exportiert wurde.

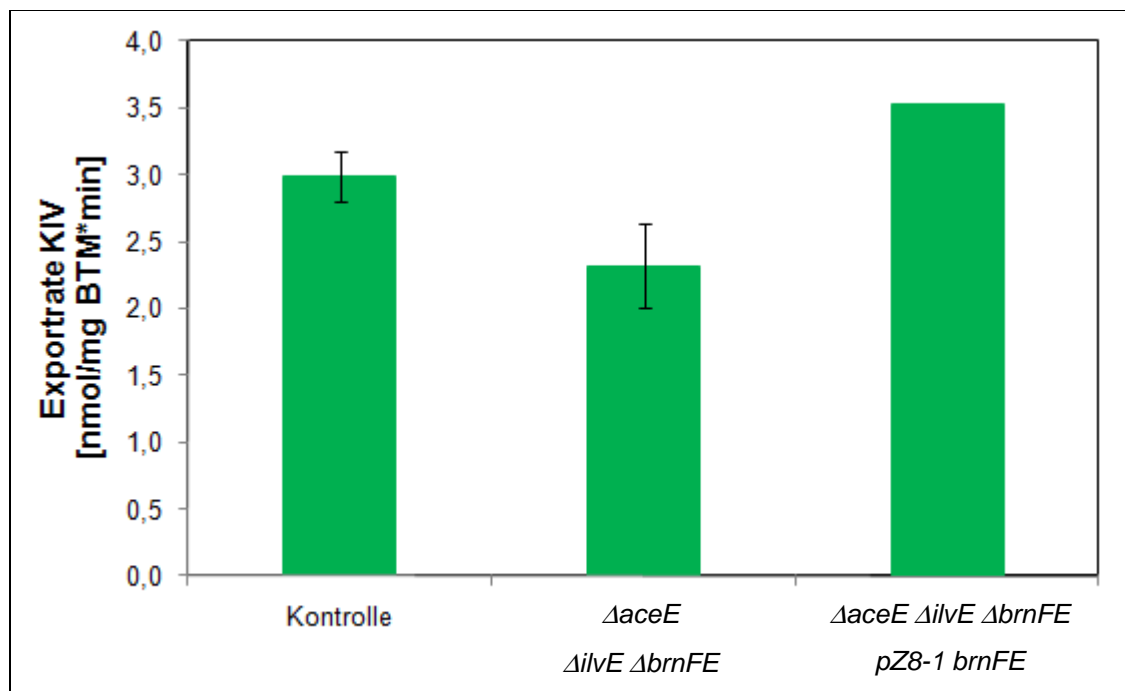


Abb. 6.4.2.1: Gemessene KIV-Exportraten von *C. glutamicum* $\Delta aceE \Delta ilvE$ (Kontrolle), einer Deletionsmutante *C. glutamicum* $\Delta aceE \Delta ilvE \Delta brnFE$ und einer Überexpressionsmutante *C. glutamicum* $\Delta aceE \Delta ilvE \Delta brnFE$ pZ8-1 brnFE

Dafür wurden Exportmessungen vom KIV-Referenzstamm *C. glutamicum* $\Delta aceE \Delta ilvE$, von einer zusätzlichen Deletionsmutante *C. glutamicum* $\Delta aceE \Delta ilvE \Delta brnFE$ [AG Eikmanns, Uni Ulm] und einer Überexpressionsmutante *C. glutamicum* $\Delta aceE \Delta ilvE$

ΔbrnFE pZ8-1 brnFE [Trötschel 2005] durchgeführt. In Abb. 6.4.2.1 sind die gemessenen Exportraten für KIV graphisch dargestellt. Für die tatsächliche Exportrate von KIV müsste noch der Import von KIV mit einbezogen werden. Die Deletion von *brnFE* führte jedoch nur zu einer geringen Reduktion der gemessenen Exportrate. Auch durch die Überexpression von *brnFE* konnte nur eine Steigerung der gemessenen Exportrate um ca. 10% erreicht werden.

Diese beiden Ergebnisse sprachen dafür, dass BrnFE entweder gar nicht oder zumindest nicht als Hauptsystem am Export von KIV beteiligt ist.

Es wurden nun 2 Möglichkeiten ins Auge gefasst um den Exporter für KIV und auch die beiden anderen α -Ketosäuren zu identifizieren.

Bei der ersten Möglichkeit sollten Exportmessungen vom KIV-Referenzstamm in Anwesenheit von Hemmstoffen für primär oder sekundär aktive Transporter durchgeführt werden. Anschließend könnte die so reduzierte Anzahl von Transportern weiter untersucht werden.

6.4.3 Biochemische Analyse des Exports für KIV in *C. glutamicum*

Durch die Zugabe von Hemmstoffen während der Exportmessung des KIV-Referenzstamms sollten entweder primär aktive oder sekundär aktive Transporter ausgeschaltet werden. Valinomycin und Nigericin sind Ionophore, die sekundär aktive Transporter deaktivieren. Die eingesetzten Mengen an Val/Nig reichten aus, um einen sekundär aktiven Transporter effektiv zu hemmen [Stappen *et al.* 1994]. Ortho-Vanadat hingegen ist ein Phosphatanalogon, das ATP-Bindestellen blockiert und dadurch primär aktive Transporter deaktiviert. Bei Vanadat bestand jedoch der Nachteil, dass jegliche ATP-Bindestelle blockiert wurde. Die Effizienz der Blockierung war jedoch unbekannt. Daher konnte ein primär aktiver Transporter trotz Hemmstoff aktiv sein. Mit Hilfe einer Aufnahmemessung von ^{14}C -Glukose wurde zuvor ausgeschlossen, dass Vanadat einen indirekten Einfluss auf die Glukoseaufnahme und damit auf die Produktion der α -Ketosäuren haben könnte. In Abb. 6.4.3.1 sind die Exportmessungen des Referenzstamms ohne und mit Zugabe von Val/Nig oder Vanadat dargestellt. Durch die Zugabe von Val/Nig konnte keine Abnahme des Exports von KIV beobachtet werden. Die Zugabe von Vanadat führte jedoch zu einer geringen Abnahme des Exports von KIV.

Ergebnisse

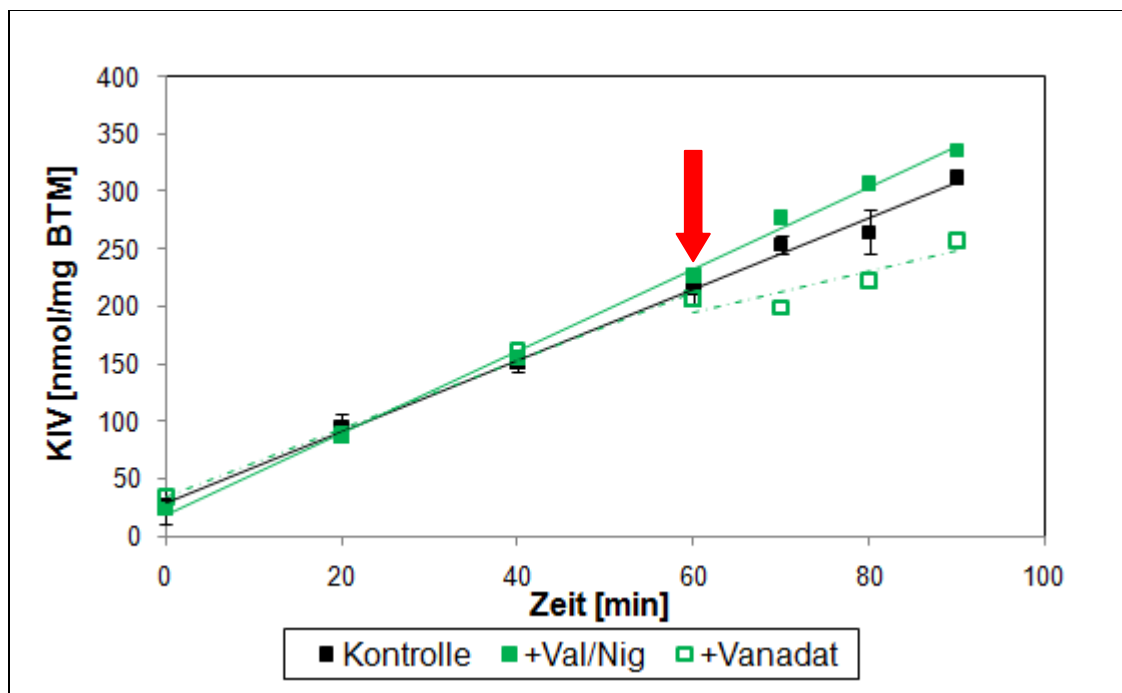


Abb. 6.4.3.1: Spezifische externe KIV-Konzentration ohne und mit Zugabe von Val/Nig oder Vanadat. Der Zugabezeitpunkt ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

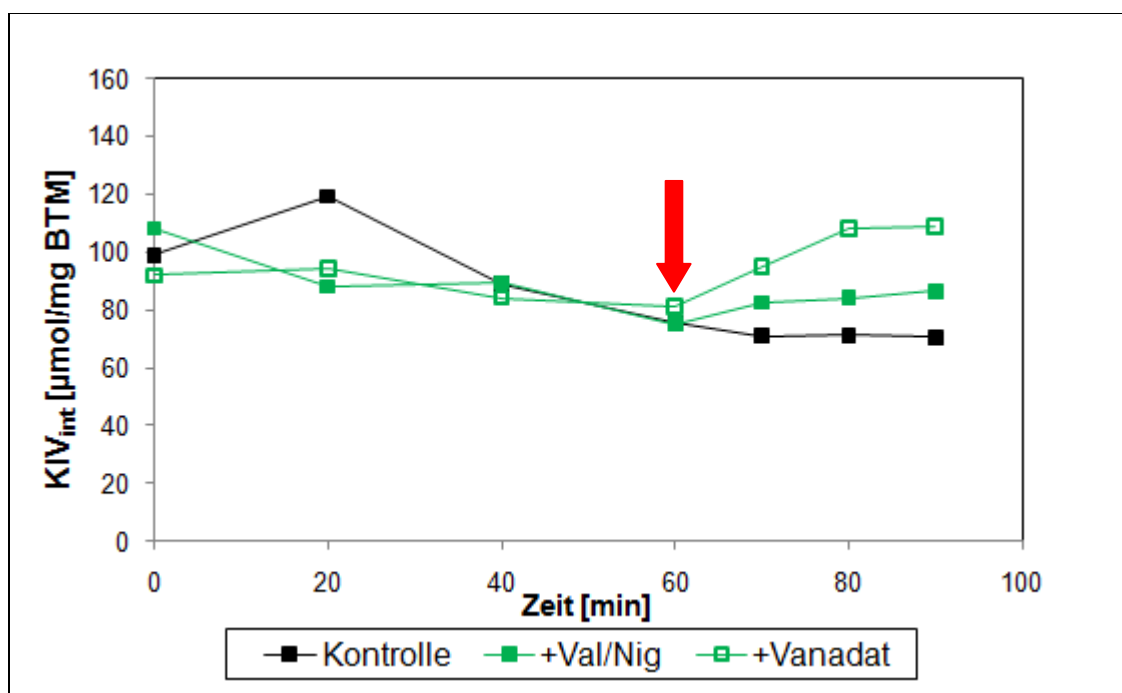


Abb. 6.4.3.2: Spezifische externe KIV-Konzentration ohne und mit Zugabe von Val/Nig oder Vanadat. Der Zugabezeitpunkt ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Bei der internen Konzentration von KIV konnte durch die Zugabe von Vanadat eine geringe Zunahme verzeichnet werden (s. Abb. 6.4.3.2), was auf die Deaktivierung eines Exporters hindeuten könnte. Dieser geringe Effekt von Vanadat auf den Export von KIV

war jedoch nicht reproduzierbar. Die Exportmessungen mit Zugabe von Val/Nig zeigten jedoch in jeder Messung keinen Einfluss von Val/Nig auf den Export von KIV. Daraus wurde geschlossen, dass KIV nicht über ein sekundär aktives Transportsystem exportiert wurde.

Daher wurde ein Screening von Mutanten mit Deaktivierung von putativ primär aktiven Exportsystemen anschließend durchgeführt.

6.4.4 Untersuchung des Exports der α -Ketosäuren über ein primär aktives Transportsystem

Es wurde angenommen, dass ein primär aktives Exportsystem kein Substratbindeprotein benötigen würde. Demnach bestehen ABC-Exporter nur aus ATPase und Permease. Dies führte zu einer Vorhersage von ca. 40 putativen primär aktiven Exportsystemen in *C. glutamicum*. Davon wurden 37 der entsprechenden Gene im Laufe der Doktorarbeit von Bettine Boltres durch Insertion in *C. glutamicum* RES 167 ausgeschaltet [Boltres 2009]. Die restlichen 3 Transporter waren wahrscheinlich essentiell und konnten deshalb nicht deaktiviert werden.

Es bestand nun die Annahme, dass eine Mutante mit einem deaktivierten Exporter für die α -Ketosäuren schlechter auf Gradientenplatten der α -Ketosäuren wachsen könnte als der Vergleichsstamm *C. glutamicum* RES 167. Deshalb wurden Kulturen der 37 Exportermutanten auf Gradientenplatten der α -Ketosäuren aufgetropft. Neben KIV wurden auch KIL und KIC untersucht, da ein Exporter für KIV auch die beiden anderen α -Ketosäuren exportieren könnte.

In Abb. 6.4.4.1 sind beispielhaft alle Mutanten mit jeweils dem Referenzstamm *C. glutamicum* RES 167 und *C. glutamicum* ATCC 13032 auf KIL-Gradientenplatten dargestellt. Dabei war eine Mutante besonders auffällig. Die Mutante Nr. 24 wuchs deutlich schlechter als der Referenzstamm *C. glutamicum* RES 167, aber auch als alle anderen Mutanten.

Ergebnisse

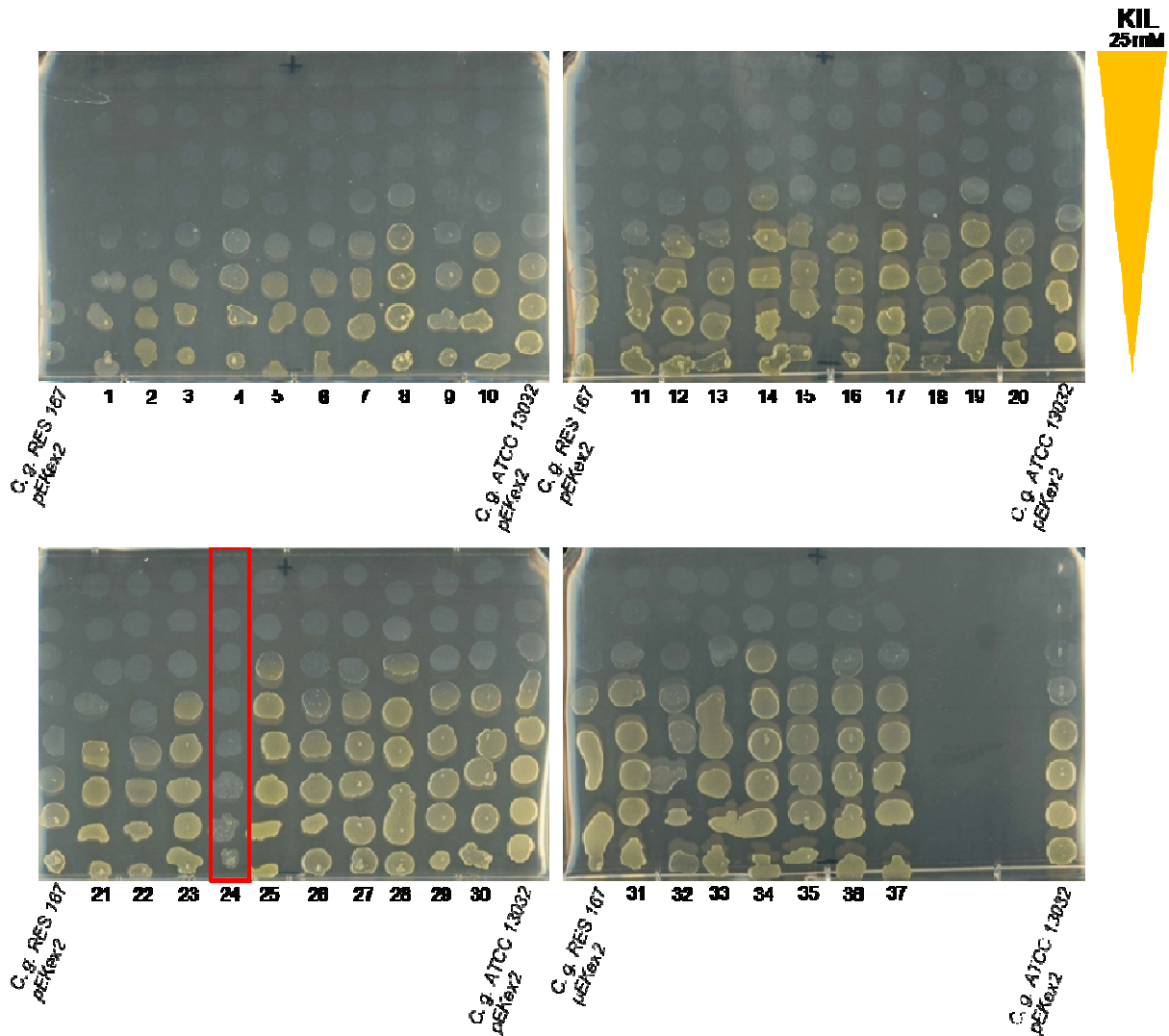


Abb. 6.4.4.1: Wachstum der ABC-Transportermutanten (1-37) und der Referenzstämme *C.glutamicum* und *C.glutamicum* RES 167 auf KIL-Gradientenplatten. Die Mutante Nr. 24, die deutlich schlechter als alle anderen Mutanten wuchs, ist rot markiert.

Auch auf KIV war ein deutlich schlechteres Wachstum dieser Mutante zu beobachten (s. Abb. 6.4.4.2). Für KIC war die maximale Konzentration mit 25 mM zu hoch gewählt, denn auf diesen Gradientenplatten war kaum Wachstum von den Mutanten und dem Referenzstamm zu verzeichnen.

Ergebnisse

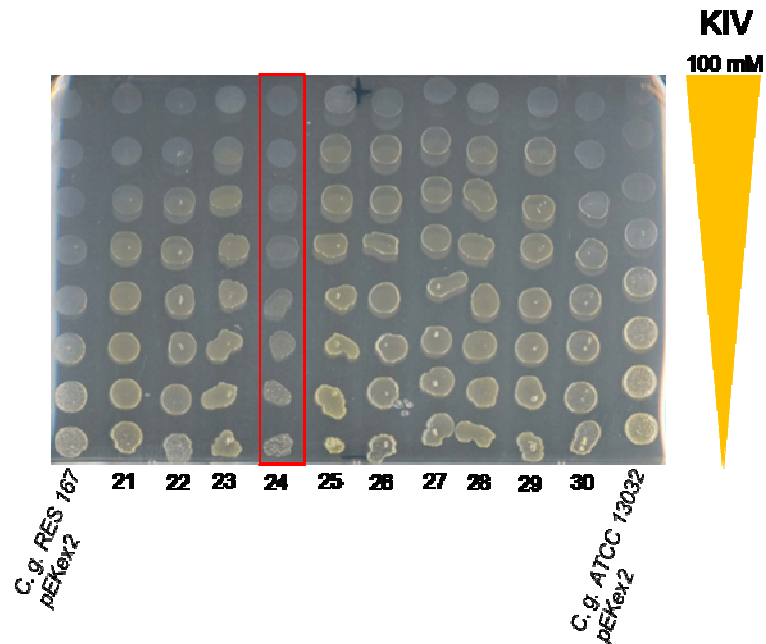


Abb. 6.4.4.2: Wachstum der ABC-Transportermutanten (21-30) und der Referenzstämm *C. glutamicum* und *C. glutamicum* RES 167 auf einer KIV-Gradientenplatte. Die Mutante Nr. 24, die deutlich schlechter als alle anderen Mutanten wuchs, ist rot markiert.

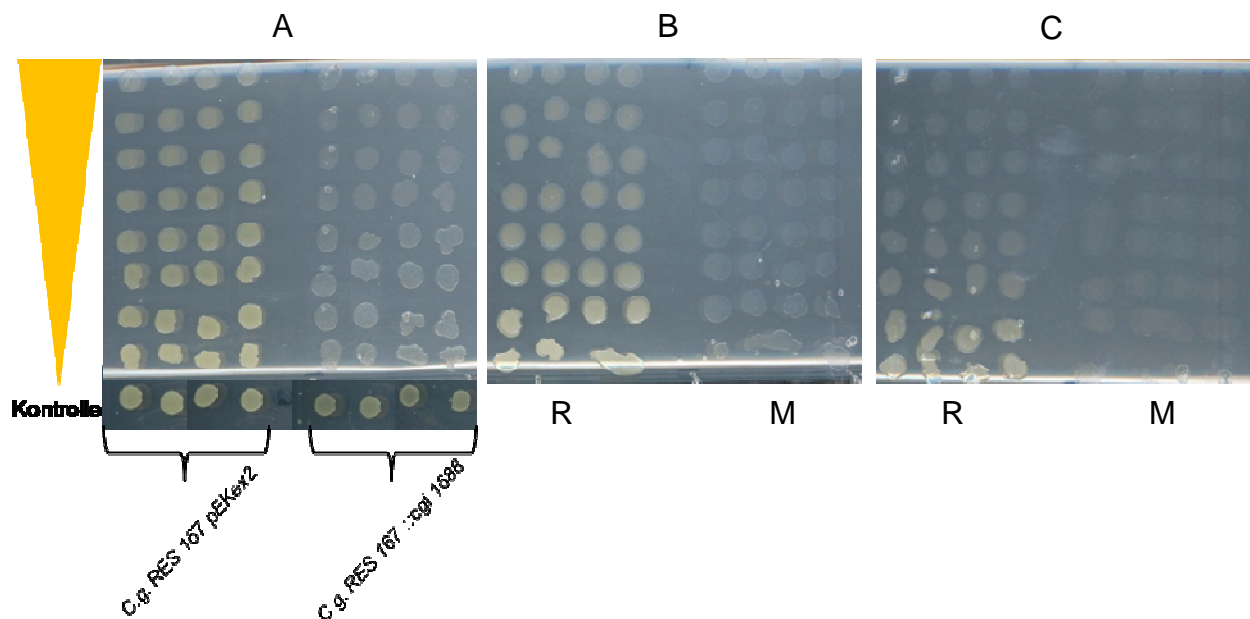


Abb. 6.4.4.3: Wachstum der ABC-Transportermutanten Nr. 24 (*cg1688*; M: Mutante) und des Referenzstamms *C. glutamicum* RES 167 (R: Referenz) auf Gradientenplatten der α -Ketosäuren (A: 0-25 mM KIL; B: 0-100 mM KIV; C: 0-25 mM KIC).

In Mutante Nr. 24 war das Gen *cg1688* durch Insertion deaktiviert worden. Es konnte jedoch auch auf allen Gradientenplatten beobachtet werden, dass der Referenzstamm *C. glutamicum* RES 167 etwas sensibler gegenüber den α -Ketosäuren reagierte als

Ergebnisse

C. glutamicum. Zur Überprüfung des Ergebnisses wurden die Mutante *C. glutamicum* RES 167 ::*cgl1688* und der Referenzstamm in parallelen Ansätzen wieder auf Gradientenplatten der α -Ketosäuren aufgetropft (s. Abb. 6.4.4.3).

Erneut konnte das deutlich schlechtere Wachstum der Mutante gegenüber dem Referenzstamm auf allen 3 α -Ketosäuren beobachtet werden.

Um das Wachstum der Mutante gegenüber dem Referenzstamm auch in flüssigem Medium zu untersuchen, wurden beide Stämme mit ansteigenden Konzentrationen der α -Ketosäuren in Mikrotiterplatten kultiviert. Dabei konnte das Wachstumsverhalten beider Stämme beobachtet werden. Es konnte jedoch kein Unterschied im Wachstum zwischen der Mutante *C. glutamicum* RES 167 ::*cgl1688* und dem Referenzstamm festgestellt werden.

Um nun die Beteiligung des ABC-Transporters am Export der α -Ketosäuren zu untersuchen, wurde eine Überexpressionsmutante des gesamten Transporters im $\Delta aceE \Delta ilvE$ -Hintergrund erstellt und der Export von KIV gemessen. Bei einem putativen 2. Exporter für die α -Ketosäuren sollte eine Überexpression von *cgl1687-88* trotzdem zu einem erhöhten Export von KIV führen, wenn dieser ABC-Transporter am Export von KIV beteiligt wäre. Wie in Abb. 6.4.4.4 dargestellt wird der ABC-Transporter laut bioinformatischer Vorhersage von den Genen *cgl1687* und *cgl1688* kodiert.

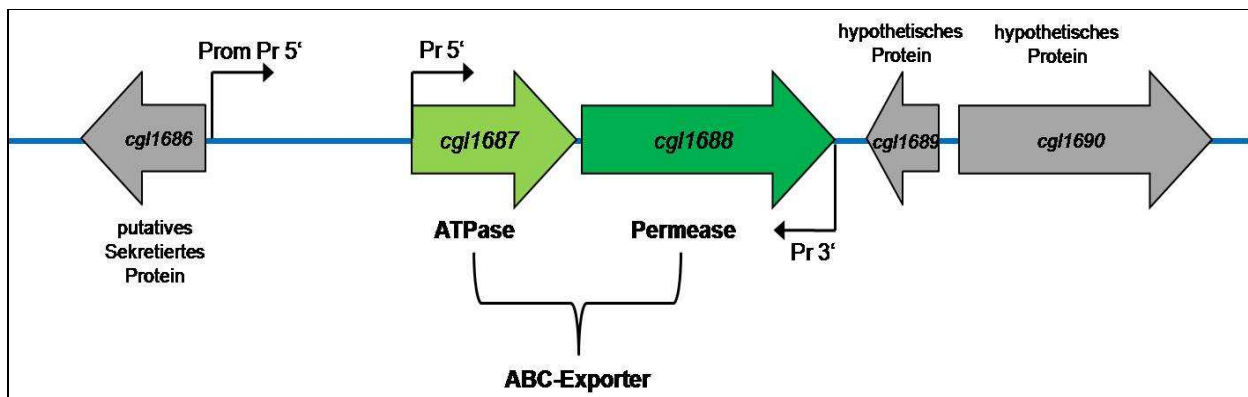


Abb. 6.4.4.4: Genetische Umgebung des putativen ABC-Exporters Cgl1687-88 mit vorhergesagter Funktion der beiden Proteine, sowie Darstellung der Primer, die für die Konstruktion der Überexpressionsplasmide verwendet wurden

Das Protein Cgl1687 besteht aus 199 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von ca. 22 kDa. Da in der strukturellen Vorhersage keine Transmembrandomäne (TMD) enthalten war, deckt sich dies mit der funktionellen Vorhersage als ATPase. Cgl1688

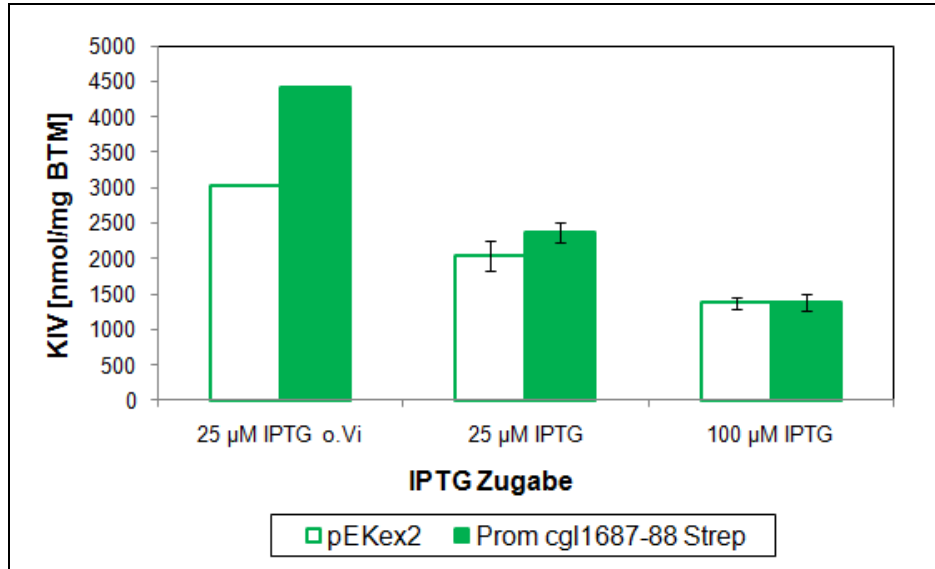
Ergebnisse

wird aus 333 Aminosäuren gebildet mit einem Molekulargewicht von 36 kDa. Für dieses Protein wurden 6 TMD vorhergesagt [web 3], was ebenfalls zu der funktionellen Vorhersage als Permease passt.

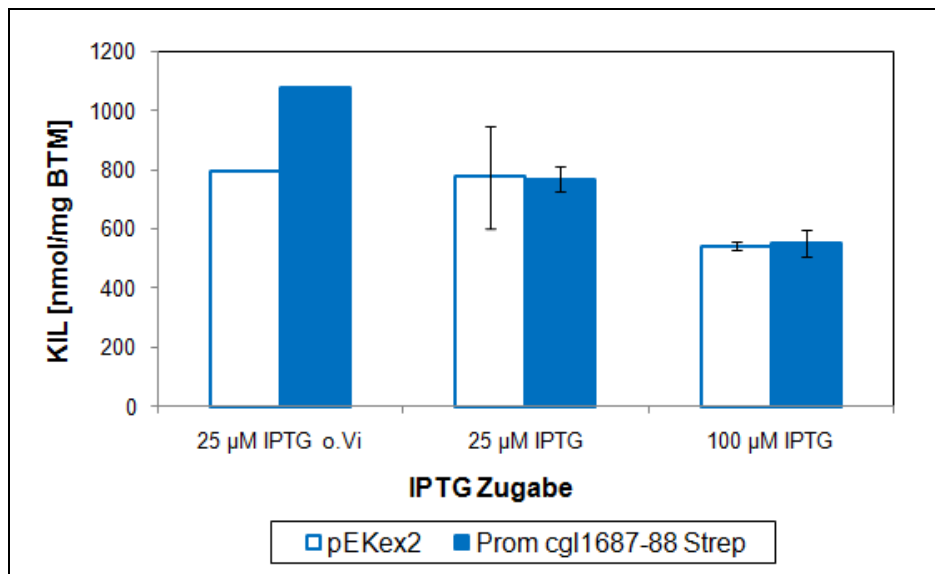
Es wurden 2 Überexpressionsplasmide konstruiert. In das erste Plasmid wurde das PCR-Produkt der beiden Primer Pr 5' und Pr 3' (s. Abb. 6.4.4.4), also nur die beiden Gene *cgl1687-88*, ligiert. In das zweite Plasmid wurde das PCR-Produkt von PromPr 5' und Pr 3' ligiert. Dieses Fragment enthielt neben den beiden Genen *cgl1687-88* auch den gesamten Bereich zwischen *cgl1686* und *cgl1687* als putativen Promotorbereich. Pr 3' enthielt zusätzlich die Sequenz für einen Strep-Tag. Dadurch wurde das Protein Cgl1688 mit einem Strep-Tag am C-Terminus versehen. Beide Plasmide wurden in den $\Delta aceE \Delta ilvE$ -Hintergrund für die Messung des KIV-Exports und den $\Delta ltbR \Delta ilvE$ -Hintergrund für die Messung des KIL- und KIC-Exports transformiert und anschließend Exportmessungen mit den Stämmen durchgeführt. In der ersten Messung wurde 25 μ M IPTG zur Induktion der Genexpression erst zur Messung hinzugefügt. Durch die Überexpression der beiden Transportergene konnte kein Effekt auf den Export von KIV ($\Delta aceE \Delta ilvE$ -Hintergrund) oder den Export von KIL und KIC ($\Delta ltbR \Delta ilvE$ -Hintergrund) verzeichnet werden. Durch die Überexpression der Transportergene in Kombination mit dem Promotorbereich konnte eine Steigerung des Exports aller 3 α -Ketosäuren beobachtet werden. Dieser Versuch wurde jedoch nur in einer Einfachbestimmung durchgeführt. Im nächsten Experiment wurden 100 μ M IPTG schon in die letzte Vorkultur und zur Messung hinzugefügt. Damit sollte eine stärkere Expression der Transportergene und demnach eine höhere Exportrate der α -Ketosäuren erreicht werden. Diese erhöhte Zugabe an IPTG hatte jedoch genau den gegenteiligen Effekt. Es war in beiden Produktionshintergründen kein erhöhter Export der α -Ketosäuren durch die Überexpression der Transportergene zu verzeichnen. Deshalb wurde der Versuch mit Zugabe von 25 μ M IPTG in der letzten Vorkultur und der Messung wiederholt. Dabei konnte für KIV und KIC wieder ein leicht erhöhter Export durch die Überexpression der Transportergene beobachtet werden. Die spezifischen Konzentrationen der α -Ketosäuren nach 19 h für alle 3 Versuche mit unterschiedlichen IPTG-Konzentrationen sind in Abb. 6.4.4.5 A-C zusammengefasst.

Ergebnisse

A



B



C

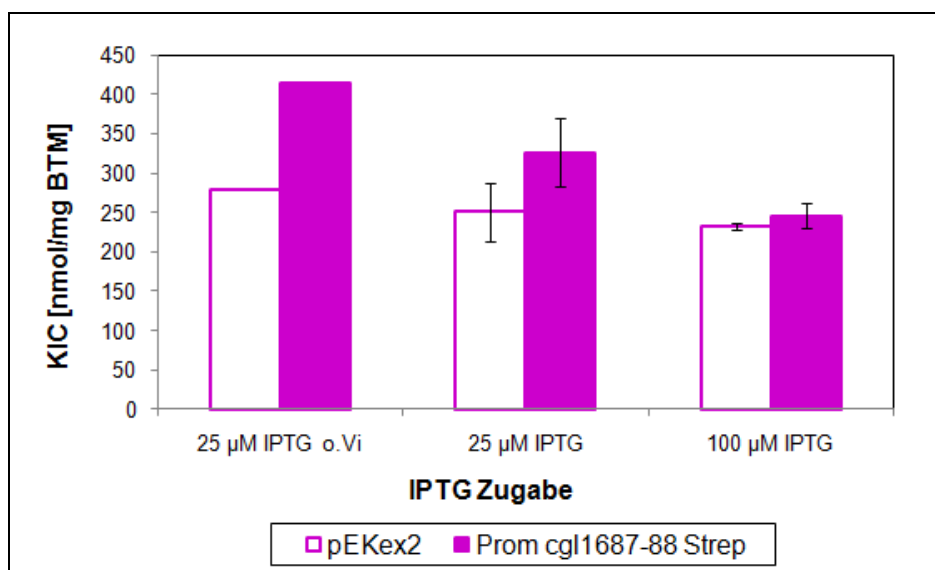


Abb. 6.4.4.5:

Spezifische externe Konzentrationen nach 19 h von KIV (A) im $\Delta aceE \Delta ilvE$ -Hintergrund, sowie KIL (B) und KIC (C) im $\Delta ltbR \Delta ilvE$ -Hintergrund gemessen in der Überexpressionsmutante *Prom cgl 1687-88 Strep* und dem jeweiligen Referenzstamm nach Zugabe von unterschiedlichen IPTG-Konzentrationen (o.Vi.: ohne Vorinkubation; IPTG Zugabe erst zur Messung)

Ergebnisse

Die durchgeführten Exportmessungen deuteten darauf hin, dass Cgl1687-88 am Export aller drei α -Ketosäuren beteiligt ist. Die Expression der Gene *cgl1687-88* hatte jedoch nur einen positiven Effekt auf den Export der α -Ketosäuren, wenn der native Promotor im Plasmid und wenn nur geringe Mengen an IPTG während der Exportmessung vorhanden waren.

Da das Protein Cgl1688 mit einem Strep-Tag versehen war, wurde auch ein Westernblot eines Zellaufschlusses von *C. glutamicum* $\Delta aceE \Delta ilvE$ *pEKex2 Prom cgl 1687-88 Strep* und *C. glutamicum* $\Delta ltbR \Delta ilvE$ *pEKex2 Prom cgl 1687-88 Strep* sowie der Referenzstämmen durchgeführt. Das SDS-Gel und der Westernblot sind in Abb. 6.4.4.6 dargestellt.

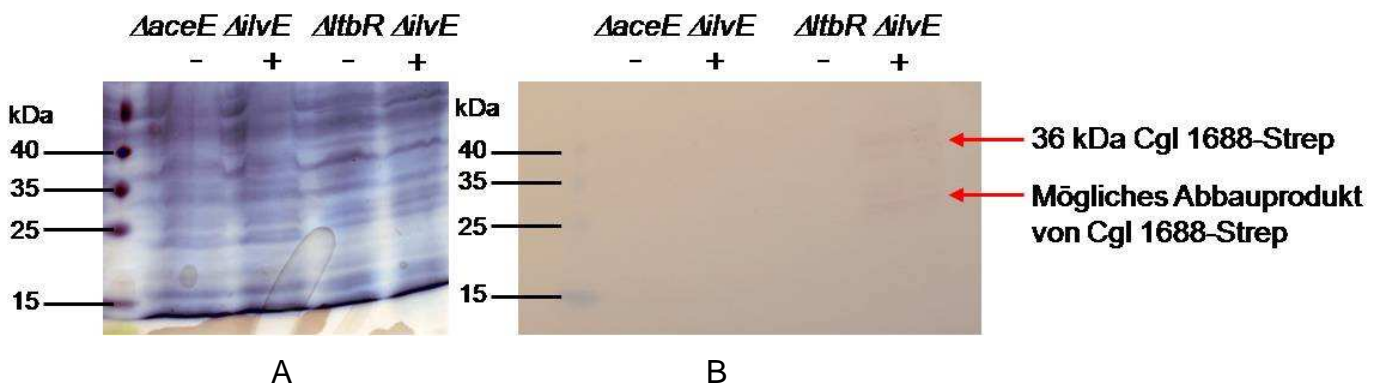


Abb. 6.4.4.6: A: SDS-Gel des Zellaufschlusses von *C. glutamicum* $\Delta aceE \Delta ilvE$ *pEKex2 Prom cgl 1687-88 Strep* und *C. glutamicum* $\Delta ltbR \Delta ilvE$ *pEKex2 Prom cgl 1687-88 Strep* sowie der Referenzstämmen, Anfärbung mit Comassie Brilliant Blue
B: Detektion des Cgl1688-Strep Proteins aus *C. glutamicum* $\Delta aceE \Delta ilvE$ *pEKex2 Prom cgl 1687-88 Strep* und *C. glutamicum* $\Delta ltbR \Delta ilvE$ *pEKex2 Prom cgl 1687-88 Strep* sowie der Negativkontrolle aus den Referenzstämmen mittels Westernblot

Es konnte jedoch nur im $\Delta ltbR \Delta ilvE$ -Hintergrund ein sehr schwacher Nachweis für Cgl 1688-Strep gefunden werden, obwohl so viel Protein auf das SDS-Gel geladen wurde, dass das Gel komplett überladen war (s. Abb. 6.4.4.6)

Die Expression von *cgl1688-Strep* war nur sehr schwach und zusätzlich abhängig vom Stammhintergrund.

6.4.5 Screening nach Exporter für die α -Ketosäuren durch Vergleich mit *E. coli*

Nachdem BrnFE als Exporter für die α -Ketosäuren ausgeschlossen worden war, bildete den zweiten parallelen Ansatz zur Identifikation eines Exporters für die α -Ketosäuren ein möglicher Vergleich mit *E. coli*. Bereits in Flüssigkultur zeigte *E. coli* eine deutlich höhere

Ergebnisse

Sensitivität gegenüber den α -Ketosäuren als *C. glutamicum*. Daher konnten beim Screening von *E. coli*-Mutanten niedrigere Konzentrationen der α -Ketosäuren eingesetzt werden. Desweiteren wurde von der Evonik Degussa GmbH eine Genbank von *E. coli* zur Verfügung gestellt [Novak 1995]. Die Grundlage für das Screening bestand darin, dass eine Mutante, in der ein Transportergen für die α -Ketosäuren überexprimiert wurde, auf inhibierenden Konzentrationen der α -Ketosäuren wachsen könnte. Um die Mutanten isolieren zu können, sollte das Screening der Genbank auf festem Medium durchgeführt werden. Es musste jedoch zuerst die maximalen inhibierenden Konzentrationen der α -Ketosäuren auf festem Medium ermittelt werden. Dafür wurde eine Minimalmediumkultur von *E. coli DH5 α* auf Gradientenplatten der α -Ketosäuren ausgestrichen (s. Abb. 6.4.5.1). Es wurde *E. coli DH5 α* verwendet, da dieser Stamm mit der Genbank transformiert werden sollte.

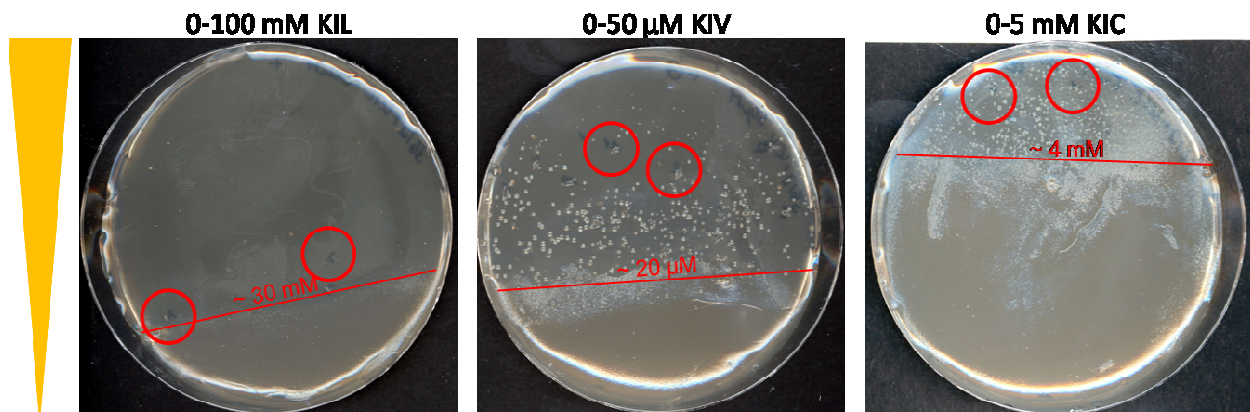


Abb. 6.4.5.1: Wachstum von *E. coli DH5 α* auf Gradientenplatten der α -Ketosäuren (KIL 0-100 mM, KIV 0-50 μ M, KIC 0-5 mM) mit Kennzeichnung der Wachstumsgrenze (---) und Markierung von Einzelkolonien (○), die bei höheren Konzentrationen als *E. coli DH5 α* wachsen konnten und demnach als Spontanmutanten angesehen wurden

Die Wachstumsgrenze auf den Gradientenplatten lag bei KIL mit ca. 30 mM und bei KIC mit ca. 4 mM deutlich höher als bei Kultivierung in flüssigem Medium. Bei KIV hingegen war das Wachstum auf festem und in flüssigem Medium vergleichbar.

Diese Konzentrationen konnten als Richtlinien für das Screening der *E. coli* Genbank eingesetzt werden.

Wie bei *C. glutamicum* entwickelten sich Spontanmutanten, die bei höheren Konzentrationen wachsen konnten im Vergleich zum Wildtyp. Dies geschah jedoch bereits nach 0,5 d. Die ca. 90 Spontanmutanten wurden isoliert, auf Komplexmedium zwischenkultiviert und wieder auf Gradientenplatten der α -Ketosäuren, von denen sie

Ergebnisse

isoliert wurden, über den gesamten Gradienten ausgestrichen, um die Stabilität der Mutation zu testen (s. Abb. 6.4.5.2 A-C). 11 Spontanmutanten von KIL-, 34 von KIV- und 4 von KIC-Gradientenplatten wurden als stabile Spontanmutanten betrachtet, da sie ein deutlich besseres Wachstum als der Wildtyp zeigten.

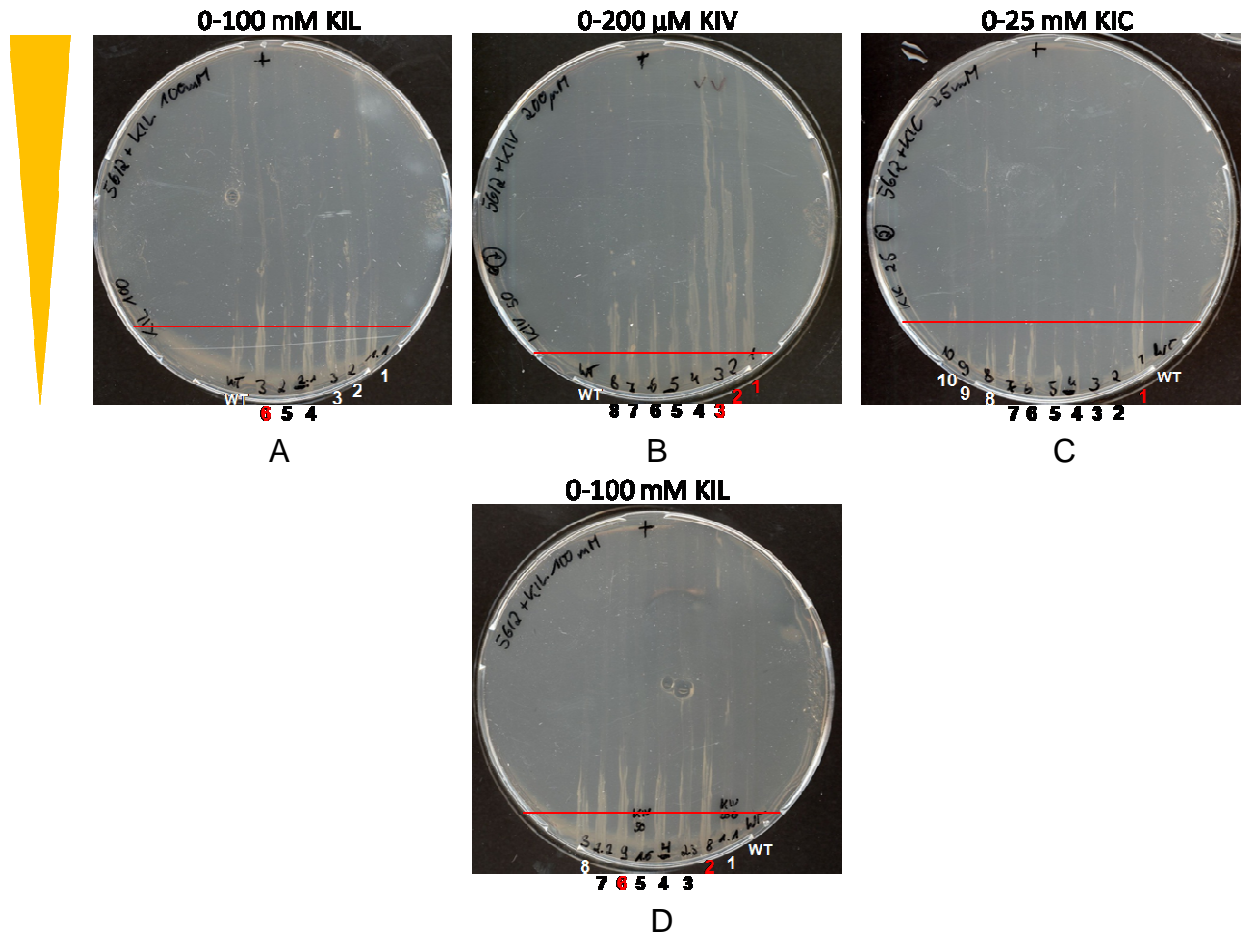


Abb. 6.4.5.2: Gradientenplatten der α -Ketosäuren mit Ausstrich der Zellen über den gesamten Gradienten von 6 Spontanmutanten von KIL- (A), 8 Spontanmutanten von KIV- (B), 10 Spontanmutanten von KIC-Gradientenplatten (C) und *E. coli* DH5α. Die Wachstumsgrenze des Wildtyps ist mit (--) gekennzeichnet. Alle rot unterlegten Spontanmutanten konnten bei höheren Konzentrationen der α -Ketosäuren wachsen und wurden als stabil betrachtet. Bei D wurden 8 Spontanmutanten von KIV auf eine KIL-Gradientenplatte aufgetragen.

Die Spontanmutanten, die von KIV-Gradientenplatten ausgewählt wurden, wurden zusätzlich auf einer 0-100 mM KIL-Gradientenplatte ausgestrichen. Auch bei KIL zeigten diese Mutanten ein besseres Wachstum als der Wildtyp. Demnach schienen die Mutationen, die bei KIV entstanden waren auch einen Wachstumsvorteil in Anwesenheit von KIL zu bewirken.

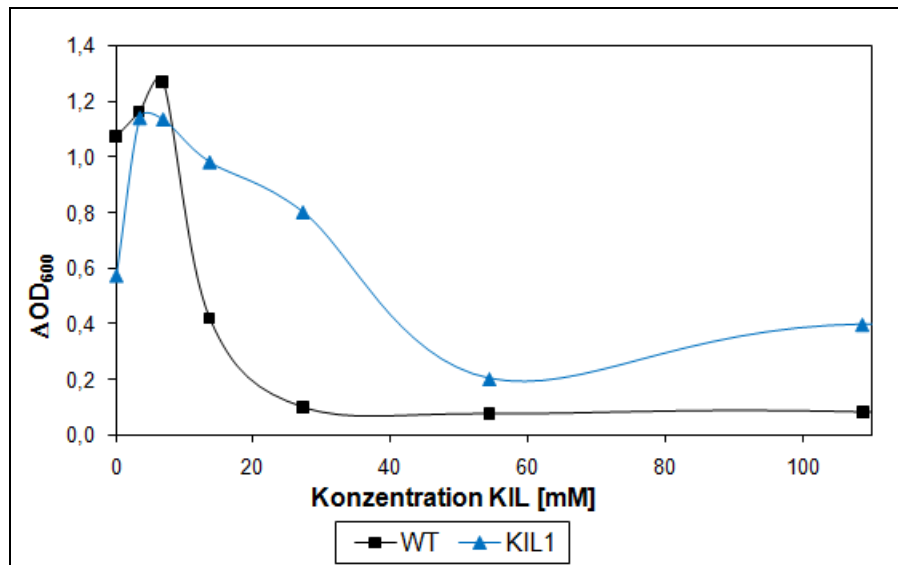
Ergebnisse

Beim Screening der *E. coli* Genbank sollten die Mutanten nicht länger als einen Tag auf den α -Ketosäuren inkubiert werden, da sonst Sekundärmutationen entstehen konnten. Wie bei *C. glutamicum* wurden die ausgewählten Spontanmutanten von *E. coli* zur Beobachtung des Wachstumsverhaltens und zur weiteren Reduktion der Anzahl in Mikrotiterplatten mit ansteigenden Konzentrationen der α -Ketosäuren untersucht. In Abb. 6.4.5.3 ist das Wachstum nach 15 h der Spontanmutanten, die den größten Unterschied zu *E. coli DH5 α* zeigten, zusammen mit dem Wachstum von *E. coli DH5 α* dargestellt. In den Mikrotiterplatten war der Unterschied in Anwesenheit von KIL am geringsten. Bei KIC zeigten die Spontanmutanten, die von KIC-Gradientenplatten isoliert worden waren, bis 25 mM KIC ein deutlich besseres Wachstum als der Wildtyp. Darüber war auch bei diesen Spontanmutanten kein Wachstum mehr vorhanden. Die Spontanmutanten, die von KIV-Gradientenplatten isoliert worden waren, zeigten jedoch den deutlichsten Unterschied im Vergleich zum Wildtyp beim Wachstum in Anwesenheit von KIV. Auf diese Mutanten hatte KIV keine inhibierende Wirkung mehr. Der Wildtyp konnte ab 100 μ M KIV schon nicht mehr wachsen. Die Spontanmutanten zeigten jedoch sogar bei 55 mM KIV noch ein vergleichbares Wachstum zur Kontrolle.

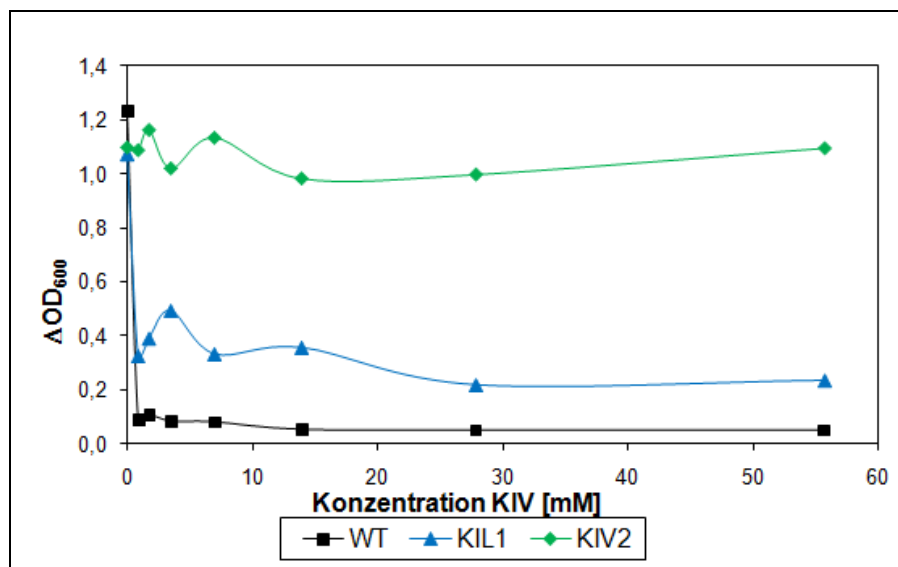
Die Anzahl der Spontanmutanten konnte auf 12 vielversprechende Kandidaten reduziert werden (s. Abb. 6.4.5.4). Die Spontanmutanten KIL1, KIV2 und KIC4 zeigten die deutlichsten Wachstumsunterschiede zu *E. coli DH5 α* und sollten weiter untersucht werden.

Ergebnisse

A



B



C

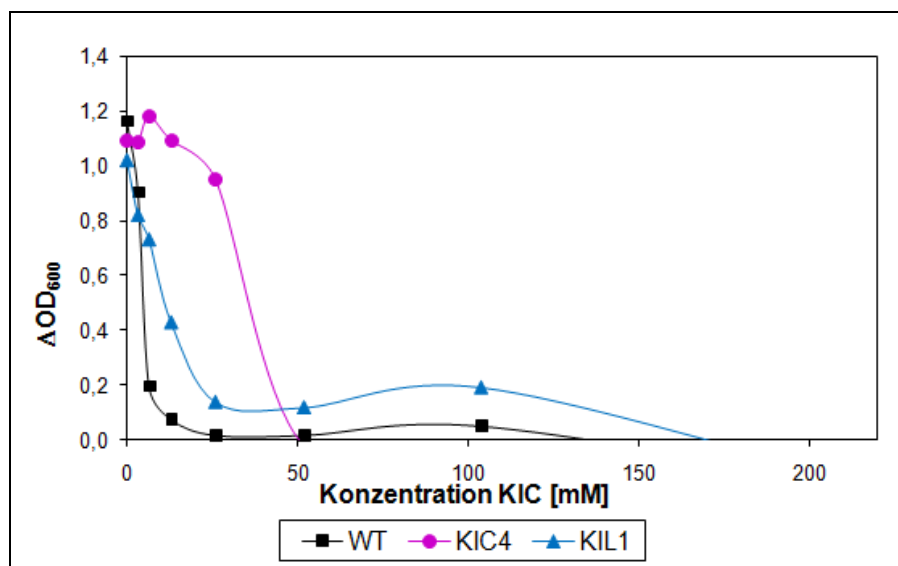


Abb. 6.4.5.3:

OD₆₀₀-Zunahme nach 15 h Kultivierung von *E. coli* DH5α und den Spontanmutanten, die den größten Wachstumsunterschied zu *E. coli* DH5α aufwiesen, auf ansteigenden Konzentrationen der α-Ketosäuren (A: KIL, B: KIV, C: KIC) in Mikrotiterplatten.

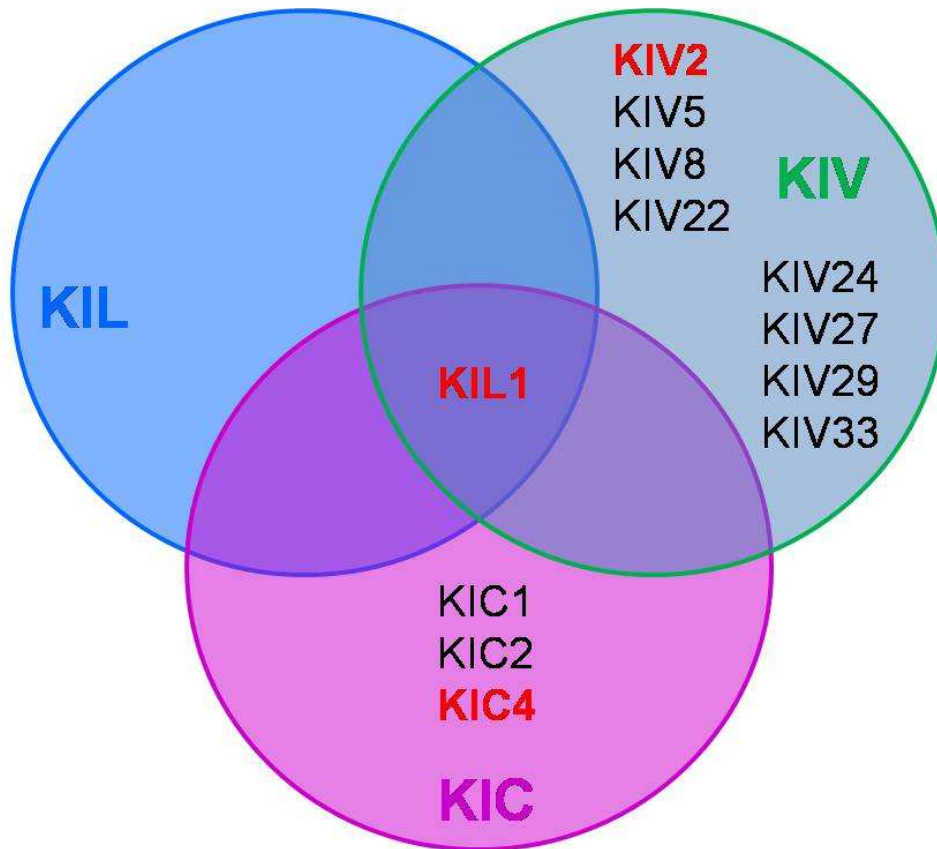


Abb. 6.4.5.4: Graphische Darstellung der Spontanmutanten, die auf den α -Ketosäuren entstanden waren und im Vergleich zu *E. coli* ein unterschiedliches Wachstum in Mikrotiterplatten zeigten. Die Mutation wurde bei diesen Mutanten als stabil betrachtet. Die Spontanmutanten sind den α -Ketosäuren zugeordnet, auf denen sie ein unterschiedliches Wachstum aufwiesen. Die rot unterlegten Mutanten zeigten den größten Unterschied zu *E. coli DH5 α* .

Für das Screening der *E. coli* Genbank wurden, basierend auf den zuvor ermittelten maximale inhibierenden Konzentrationen der α -Ketosäuren auf festem Medium, Gradientenplatten mit 0-40 mM KIL, 0-30 μ M KIV oder 0-15 mM KIC eingesetzt. Nachdem 3 Aliquots von kompetenten *E. coli DH5 α* mit je 1 μ L der Genbank transformiert worden waren wurde je ein Ansatz auf den Gradientenplatten jeweils einer α -Ketosäure komplett ausgestrichen. Nach 1 Tag Inkubation konnten 25 Kolonien von KIL-haltigen, 90 von KIV-haltigen und 19 von KIC-haltigen Agarplatten isoliert werden. Nach Restriktion von über 60 Mutanten, darunter alle Mutanten, die in Anwesenheit von KIL oder KIC wachsen konnten, mit plasmidspezifischen Enzymen wurden die Plasmide aller Klone, die eindeutig ein Insert von 2-10 kbp aufwiesen (ca. 15 Mutanten),

Ergebnisse

sequenziert. Dabei wurde jeweils der Anfangsbereich des Inserts mit einem 5' Primer (pBR2) und der Endbereich mit einem 3'-Primer (pBR3) in einer Länge von 500-1000 bp sequenziert. Die beiden sequenzierten Fragmente wurden mit dem Genom von *E. coli* MG1655 verglichen und so die enthaltenen Gene im Insert identifiziert. Dadurch konnten 10 Mutanten mit einer eindeutigen Zuordnung des Inserts identifiziert werden. 4 davon wurden von den KIL-Gradientenplatten isoliert und sind mit Angabe der Insertgröße, der Richtung im Plasmid, sowie der enthaltenen Gene mit vorhergesagter Funktion in Abb. 6.4.5.5 dargestellt.

Plasmidname	Insertgröße [bp]	Richtung im Plasmid	Gene	(Vorhergesagte) Funktion
pKIL3	4000	Leserichtung	<i>bssS</i>	predicted protein
			<i>dinI</i>	DNA damage-inducible protein I
			<i>pyrC</i>	dihydro-orotase (pyrimidine metabolism)
			<i>yceB</i>	predicted lipoprotein
pKIL12	4000	Leserichtung	<i>bssS</i>	predicted protein
			<i>dinI</i>	DNA damage-inducible protein I
			<i>pyrC</i>	dihydro-orotase (pyrimidine metabolism)
			<i>yceB</i>	predicted lipoprotein
pKIL21	2000	invertiert	<i>yibD</i>	predicted glycosyl transferase
			<i>yibQ</i>	predicted polysaccharide deacetylase
pKIL25	3000	invertiert	<i>hns</i>	global DNA-binding transcriptional dual regulator H-NS
			<i>galU</i>	glucose-1-phosphate uridylyltransferase
			<i>rssB</i>	response regulator of RpoS

Abb. 6.4.5.5 Genomzuordnung der sequenzierte Inserts der Mutanten, die in Anwesenheit von KIL wachsen konnten mit Insertgröße, Richtung des Inserts im Plasmid, enthaltene Gene und Vorhersage der Funktion der kodierten Proteine. Der blaue Pfeil stellt das sequenzierte Fragment in 5'-Richtung und der rote Pfeil in 3'-Richtung dar.

Die Inserts in den Plasmiden pKIL3 und pKIL12 enthielten dieselben Gene. Die Gene *bssS* und *yceB* kodierten putative Proteine. Das Protein DinI ist in die Reparatur von DNA involviert [Renzette *et al.* 2007]. Das Gen *pyrC* kodiert die Dihydro-Orotase des Pyrimidine-Stoffwechsels. Für die beiden Gene *yibD* und *yibQ* aus dem Plasmid pKIL21 sind bisher nur Funktionen der kodierten Proteine als Glycosyltransferase oder Polysaccharid-Deacetylase vorhergesagt. Das Gen *hns* in Plasmid pKIL25 kodiert den

Ergebnisse

„histone-like nucleoid structuring“ H-NS-Regulator, welcher global auf Transkriptionsebene fungiert [Dame *et al.* 2000]. Das Gen *galU* kodiert eine Untereinheit der Glukose-1-Phosphat Uridyltransferase, welche am Abbau von Galaktose beteiligt ist [Neidhardt 1996]. RssB reguliert den Abbau von σ^S (RpoS) [Muffler *et al.* 1996].

Für KIL wurden jedoch keine Gene identifiziert, die putative Transporter oder auch Enzyme des BCAA-Stoffwechselweges kodierten (s. Abb. 6.4.5.5).

Bei KIV wurden dagegen in allen 3 sequenzierten Inserts (s. Abb. 6.4.5.6) nur Gene identifiziert, die die AHAS III in *E.coli* kodierten, welches das erste Enzym im Stoffwechselweg der BCAA in *E. coli* darstellte. Allerdings war in allen Inserts auch das Gen *leuO* enthalten, welches einen Aktivator des *leuABCD*-Operons kodierte [Chen *et al.* 2000].

Plasmidname	Insertgröße [bp]	Richtung im Plasmid	Gene	(Vorhergesagte) Funktion
pKIV14	4000	Leserichtung	<i>leuO</i>	DNA-binding transcriptional activator
			<i>ilvI</i>	acetolactate synthase III large subunit
			<i>ilvH</i>	acetolactate synthase III small subunit
pKIV15	4000	Leserichtung	<i>leuO</i>	DNA-binding transcriptional activator
			<i>ilvI</i>	acetolactate synthase III large subunit
			<i>ilvH</i>	acetolactate synthase III small subunit
pKIV20	5000	Leserichtung	<i>leuA</i>	2-isopropylmalate synthase
			<i>leuL</i>	<i>leu</i> -operon leader peptide
			<i>leuO</i>	DNA-binding transcriptional activator
			<i>ilvI</i>	acetolactate synthase III large subunit
			<i>ilvH</i>	acetolactate synthase III small subunit
			<i>fruR</i>	DNA-binding transcriptional dual regulator

Abb. 6.4.5.6: Genomzuordnung der sequenzierten Inserts der Mutanten, die in Anwesenheit von KIV wachsen konnten mit Insertgröße, Richtung des Inserts im Plasmid, enthaltene Gene und Vorhersage der Funktion der kodierten Proteine. Der blaue Pfeil stellt das sequenzierte Fragment in 5'-Richtung und der rote Pfeil in 3'-Richtung dar.

Es war demnach nicht eindeutig klar, ob nur die Überexpression von *ilvI* und *ilvH* und demnach der AHAS III zu einem Wachstum auf einer inhibierenden KIV-Konzentration führte, oder ob auch die Überexpression von *leuO* daran beteiligt war.

Ergebnisse

Es wurden jedoch auch Inserts sequenziert, die zu Wachstum von *E. coli* in Anwesenheit einer inhibierenden Konzentration an KIC führten. Dabei war auch das transporter-kodierende Gen *rhtC* beinhaltet (s. Abb. 6.4.5.7). Das Gen *rhtC* kodiert einen Thr-Exporter und wurde bereits erfolgreich in *C. glutamicum* überexprimiert [Diesveld *et al.* 2009]. In Plasmid pKIC3 war nur *rhtC* enthalten. In Plasmid pKIC2 war das Insert größer und enthielt auch noch die Gene *rhtB* und *recQ*. Für RhtB wird die Funktion als Homoserin und Homoserin Laktone Exporter vermutet [Zakataeva *et al.* 1999]. Das Gen *recQ* kodiert eine ATP-abhängige DNA-Helikase [Umezue *et al.* 1990]. In Plasmid pKIC8 waren die Gene *creA-D* enthalten. Für CreA ist bisher keine Funktion vorhergesagt worden. CreBC ist ein globaler Regulator der Genexpression, der bei Wachstum auf Minimalmedium aktiv ist [Avison *et al.* 2001]. Für CreD ist auch keine Funktion bekannt.

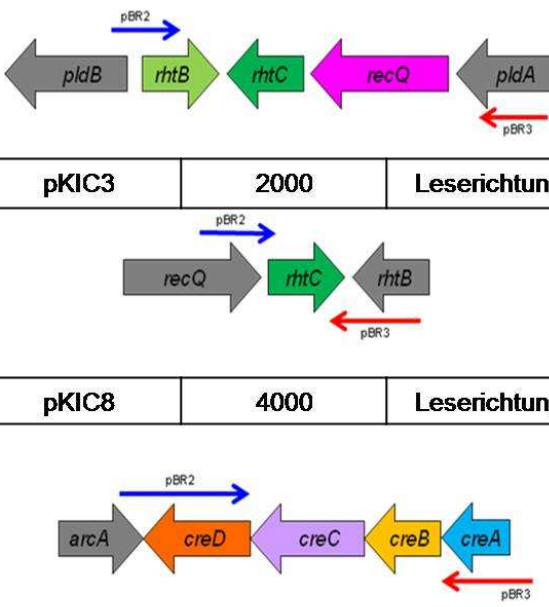
Plasmidname	Insertgröße [bp]	Richtung im Plasmid	Gene	(Vorhergesagte) Funktion
pKIC2	4000	invertiert	<i>rhtB</i>	neutral amino-acid efflux system
			<i>rhtC</i>	threonine efflux system
			<i>recQ</i>	ATP-dependent DNA-helicase
pKIC3	2000	Leserichtung	<i>rhtC</i>	neutral amino-acid efflux system
				
pKIC8	4000	Leserichtung	<i>creD</i>	inner membrane protein
			<i>creC</i>	sensory histidine kinase in two-component regulatory system with CreB or PhoB, regulator of the CreBC regulon
			<i>creB</i>	DNA-binding response regulator in two-component regulatory system with CreC
			<i>creA</i>	conserved protein

Abb. 6.4.5.7: Genomzuordnung der sequenzierten Inserts der Mutanten, die in Anwesenheit von KIC wachsen konnten mit Insertgröße, Richtung des Inserts im Plasmid, enthaltene Gene und Vorhersage der Funktion der kodierten Proteine. Der blaue Pfeil stellt das sequenzierte Fragment in 5'-Richtung und der rote Pfeil in 3'-Richtung dar.

Beim Screening der *E. coli* Genbank in Anwesenheit von KIC wurde ein Gen (*rhtC*) identifiziert, das einen Thr-Exporter kodiert. Dieser Transporter sollte anschließend bezüglich seiner Beteiligung am Export von KIC untersucht werden.

Ergebnisse

Es wurde vermutet, dass nicht nur die Überexpression von *ilvI* und *ilvH*, sondern auch die Überexpression von *leuO* am Wachstum von *E. coli* DH5 α auf KIV beteiligt war, da *leuO* in allen drei sequenzierten Inserts enthalten war. LeuO ist ein Aktivator für das *leuABCD*-Operon in *E. coli*. LeuA-D sind an der Bildung von KIL und KIC beteiligt und demnach auch am Abbau von KIV, da KIC aus KIV gebildet wird.

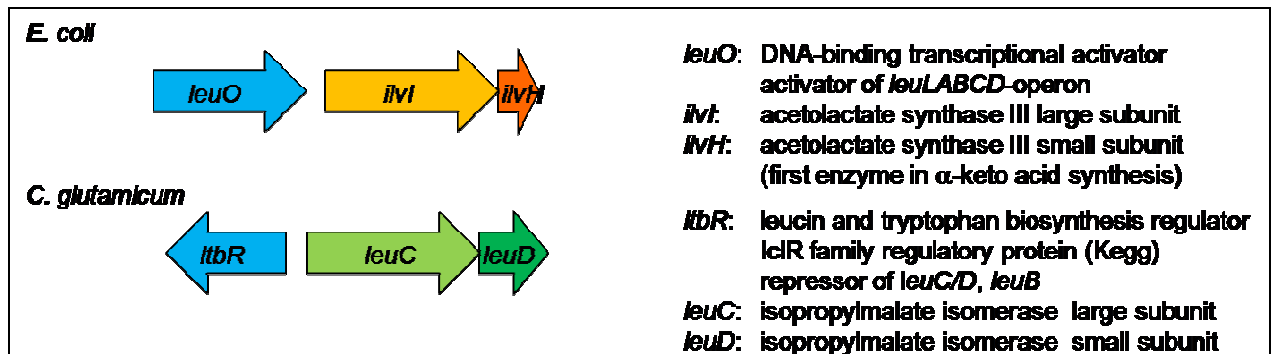


Abb. 6.4.5.8 Darstellung der genetischen Umgebung von *leuO* in *E. coli* und *ItbR* in *C. glutamicum* mit Angabe der Proteinfunktion

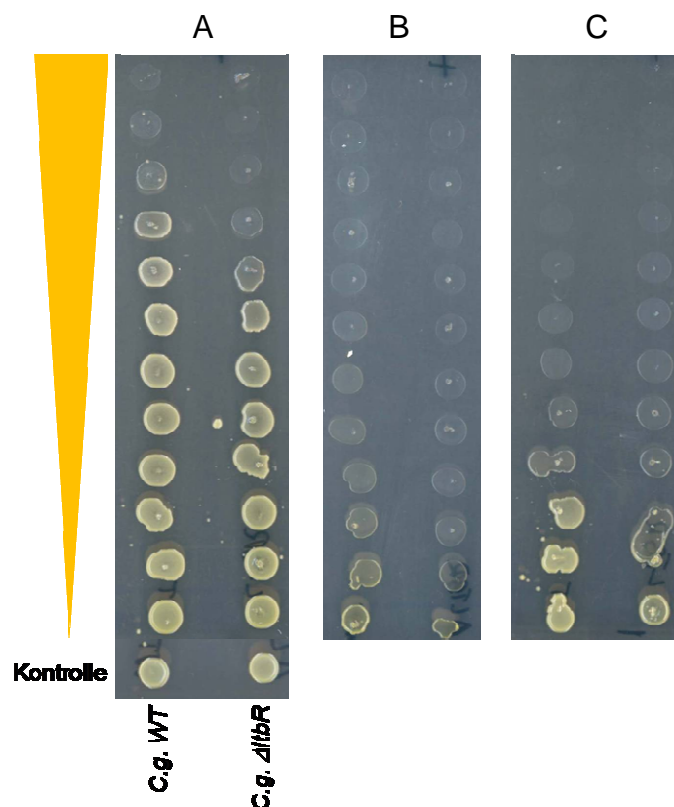


Abb. 6.4.5.9: Wachstum von *C. glutamicum* und *C. glutamicum* Δ *ItbR* auf Gradientenplatten der α -Ketosäuren (A: KIL 0-40 mM; B: KIV 0-150 mM; C: KIC 0-50 mM)

Ergebnisse

In *C. glutamicum* gibt es auch einen Regulator der *leu*-Gene, LtbR (s. Abb. 6.4.5.8). Dieser agiert allerdings als Repressor für *leuC/D* und *leuB*. LeuO und LtbR weisen eine Identität von 13,4% auf [web 4]. LeuO ist mit 314 Aminosäuren deutlich länger als LtbR mit 235 Aminosäuren. Es stellte sich die Frage, ob eine Deletion von *ltbR* in *C. glutamicum* eine vergleichbare Wirkung hervorrufen würde, wie eine Überexpression von *leuO* in *E. coli*.

Daher wurde *C. glutamicum* Δ *ltbR* [AG Eikmanns, Uni Ulm] und *C. glutamicum* auf Gradientenplatten der α -Ketosäuren aufgetropft. Wie in Abb. 6.4.5.9. dargestellt ist, wuchs die Δ *ltbR*-Mutante jedoch in Anwesenheit aller 3 α -Ketosäuren schlechter als der Wildtyp. Die aufgehobene Repression der *leu*-Gene durch die Deletion von *ltbR* schien demnach nicht auszureichen, um die Inhibition durch die α -Ketosäuren zu reduzieren, sie wurde eher noch verstärkt.

Um zu überprüfen, ob das Wachstum bei inhibierenden KIC-Konzentration durch das Plasmid der Genbank und nicht durch eine Sekundärmutation in *E. coli* hervorgerufen wurde, wurden die Plasmide pKIC2 und pKIC3 (s. Abb. 6.4.5.7) isoliert, *E. coli* DH5 α erneut damit transformiert und die Mutanten auf Gradientenplatten der α -Ketosäuren aufgetropft (s. Abb. 6.4.5.10). Es wurden auch Gradientenplatten von KIL und KIV verwendet, da die Überexpression dieses Transporters auch zu einem besseren Wachstum in Anwesenheit von KIL oder KIV führen könnte, obwohl *rhtC* während des Screenings der Genbank nicht bei KIL und KIV gefunden wurde. In Anwesenheit von KIV führte die Überexpression von *rhtC* zu keinem besseren Wachstum als *E. coli* DH5 α . Bei KIL konnte etwas besseres Wachstum der Mutanten beobachtet werden, die das Plasmid pKIC3 enthielten. Bei KIC führte die Überexpression beider Plasmid zu einem deutlich besseren Wachstum als *E. coli* DH5 α .

Das verbesserte Wachstum war demnach nicht durch eine Sekundärmutation sondern durch die Überexpression von *rhtC* hervorgerufen worden.

Ergebnisse

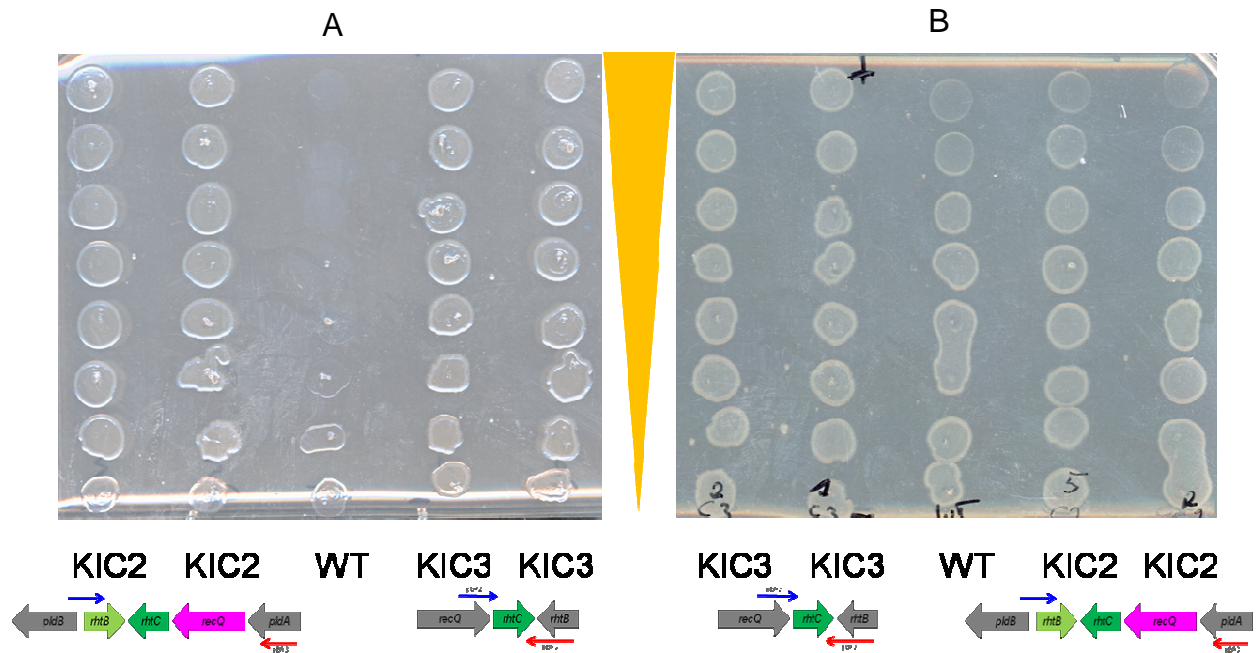


Abb. 6.4.5.10: Wachstum von *E. coli* DH5α (WT) und den retransformierten Mutanten mit dem Plasmid pKIC2 (KIC2) oder pKIC3 (KIC3) auf Gradientenplatten von 0-20 mM KIC (A) oder 0-40 mM KIL (B)

RhtC gehört zur Gruppe der RhtB-Transporter (resistant to homoserine and threonine), welche der LysE-Transporterfamilie zugerechnet werden. In *C. glutamicum* gibt es auch Vertreter der RhtB-Transporter, Cgl 0146 (RhtB 0146), Cgl 2344 (RhtB 2344) und Cgl 2656 (RhtB 2656).

Um zu testen welchen Effekt eine Überexpression von *rhtB* 0146, *rhtB* 2344 oder *rhtB* 2656 auf das Wachstum von *C. glutamicum* und auf den Export der α-Ketosäuren hatte, wurden Überexpressionsplasmide für *rhtB* 0146, *rhtB* 2344 und *rhtB* 2656 basierend auf dem pVWex1-Vektor [Evonik Degussa GmbH] zunächst für die Transformation von *C. glutamicum* eingesetzt, um erste Aussagen bezüglich des Transports der α-Ketosäuren anhand des Wachstums der Mutanten zu treffen.

Zuvor wurde jedoch untersucht, ob die Zugabe von IPTG einen Einfluss auf das Wachstum der Mutanten hatte. Dazu wurden die Mutanten sowie die Referenzstämme auf eine IPTG-Gradientenplatte aufgetropft (s. Abb. 6.4.5.11).

Ergebnisse

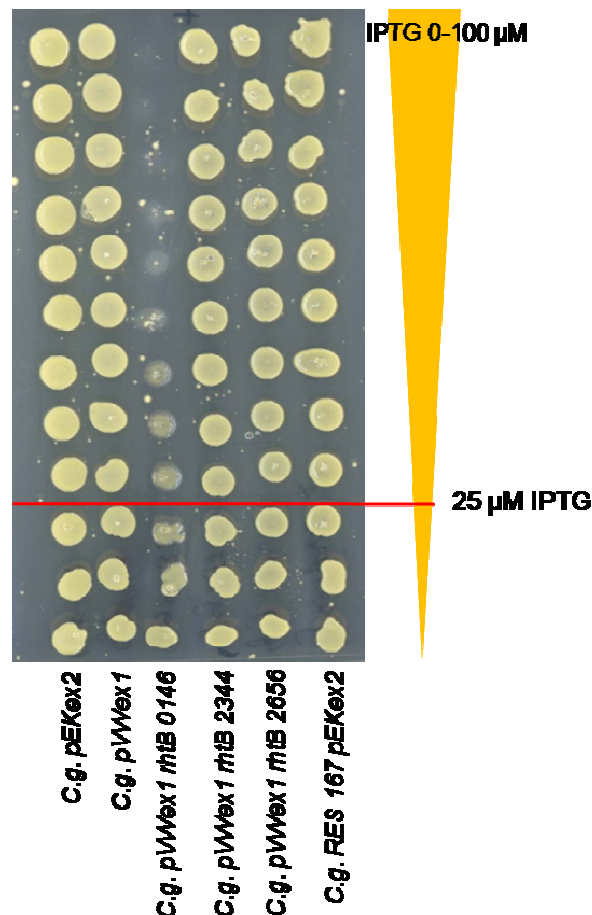


Abb 6.4.5.11: Wachstum der *rhtB*-Überexpressionsmutanten aus *C. glutamicum* sowie der Referenzstämme auf einer IPTG-Gradientenplatte

Bei der Überexpressionsmutante von *rhtB 0146* konnte nur bis ca. 25 µM IPTG annähernd vergleichbares Wachstum zu den anderen Mutanten und den Referenzstämmen beobachtet werden. Bis 50 µM IPTG war nur schwaches Wachstum und darüber kein Wachstum mehr zu verzeichnen.

Für die anschließenden Versuche wurden deshalb nur 25 µM IPTG zur Induktion der Plasmide eingesetzt.

In der Arbeitsgruppen-internen Mutantenbank waren auch Insertionsmutanten der RhtB-Transporter aus *C. glutamicum* entweder in *C. glutamicum* oder in *C. glutamicum RES 167* vorhanden. Diese Mutanten wurden in den nachfolgenden Wachstumsversuchen mit einbezogen. Auf Gradientenplatten der α -Ketosäuren wurden alle Insertions- und Überexpressionsmutanten der RhtB-Systeme aus *C. glutamicum* sowie die Referenzstämme aufgetropft und das Wachstum verfolgt. Auf der Kontrollplatte waren alle Stämme gewachsen.

Ergebnisse

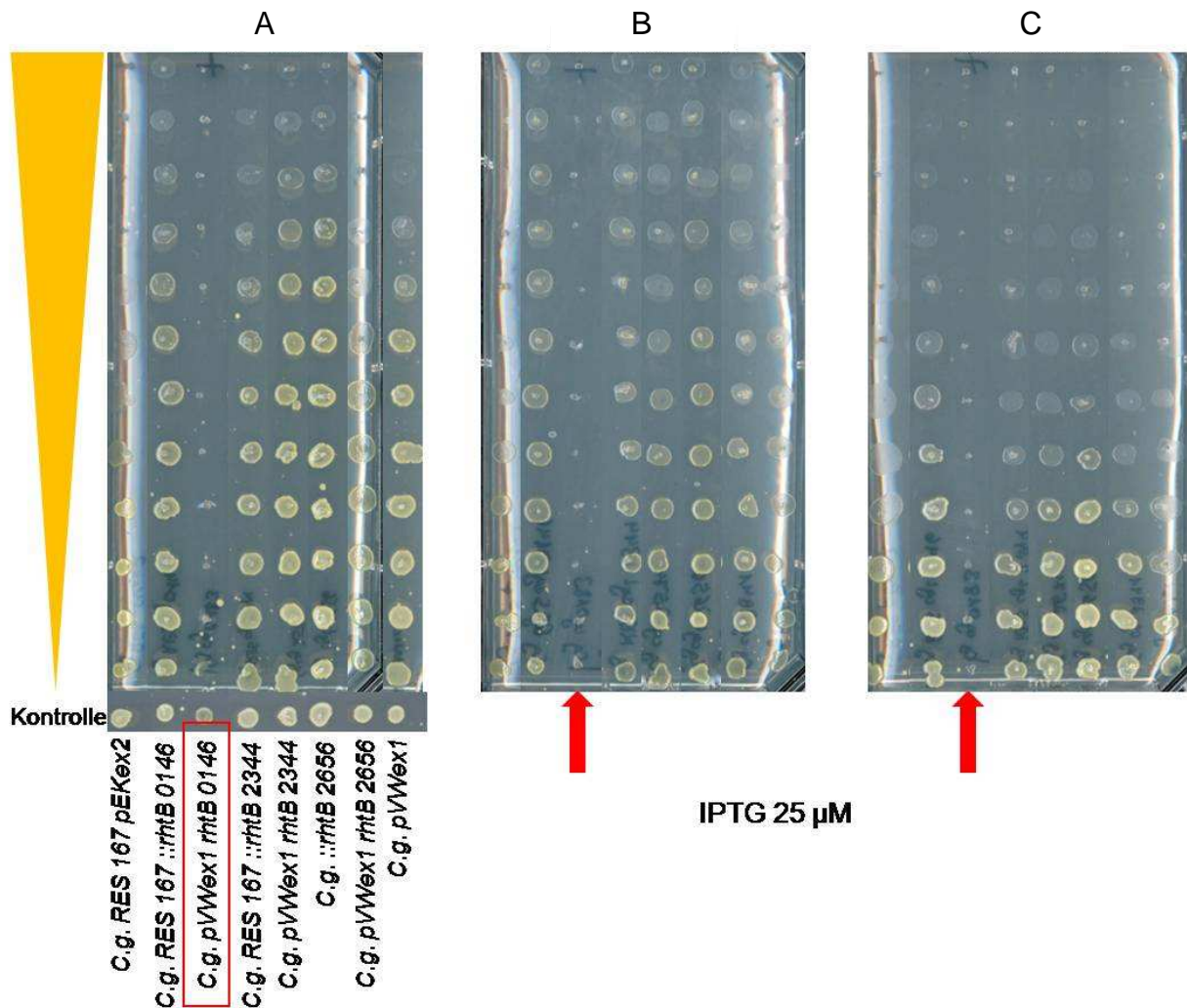


Abb. 6.4.5.12 Wachstum der *rhtB*-Insertions- und Überexpressionsmutanten aus *C. glutamicum* sowie der Referenzstämmen auf Gradientenplatten der α -Ketosäuren mit Markierung der am schlechtesten wachsenden Mutante *C. glutamicum* pVWex1 *rhtB* 0146 durch rote Umrandung und rote Pfeile (A: KIL 0-40 mM; B: KIV 0-150 mM; C: KIC 0-50 mM)

Es konnte jedoch deutlich beobachtet werden, dass *C. glutamicum* pVWex1 *rhtB* 0146 auf keiner der α -Ketosäure-Gradientenplatten wachsen konnte (s. Abb. 6.4.5.12). Die Insertionsmutante von *rhtB* 0146 zeigte hingegen bei allen 3 α -Ketosäuren ein leicht verbessertes Wachstum im Vergleich zu den Referenzstämmen. *C. glutamicum* ::*rhtB* 2656 wuchs in Anwesenheit von allen 3 α -Ketosäuren etwas besser als der Referenzstamm. Die übrigen Mutanten zeigten keinen Wachstumsunterschied zu den Referenzstämmen. Das Wachstum aller Mutanten wurde zusätzlich auch in Mikrotiterplatten mit ansteigenden Konzentrationen der α -Ketosäuren beobachtet. Es konnte jedoch kein Unterschied bezüglich der Zunahme der OD₆₀₀ zwischen den Mutanten und den Referenzstämmen verzeichnet werden.

Ergebnisse

Basierend auf dem Wachstumsverhalten war keine der Mutanten am Export der α -Ketosäuren beteiligt. Das Wachstumsverhalten von *C. glutamicum pVWex1 rhtB 0146* und *C. glutamicum ::rhtB 0146* deutet auf eine Beteiligung von RhtB 0146 am Import der α -Ketosäuren hin.

Um diese Vermutung zu untersuchen wurden Verbrauchversuche der α -Ketosäuren durch die Überexpressionsmutante und den Referenzstammes durchgeführt. Dafür wurden extern ca. 10 mM jeweils einer α -Ketosäure ins Medium gegeben.

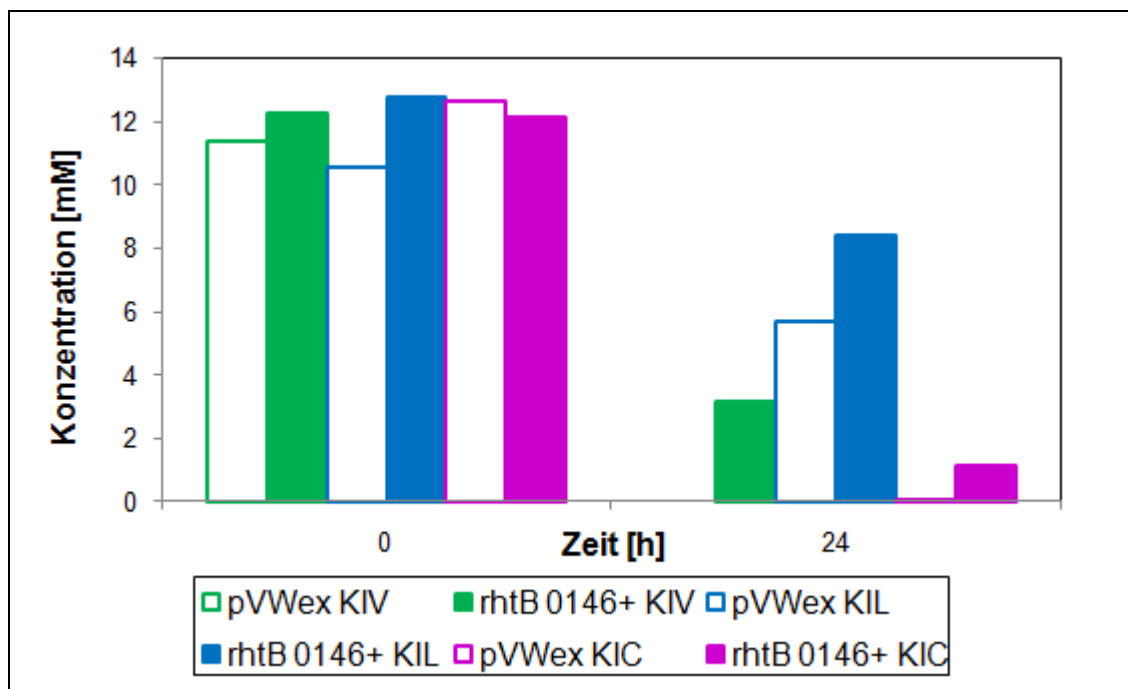


Abb. 6.4.5.13: Messung des Abbaus von ca. 10 mM jeweils einer α -Ketosäuren durch *C. glutamicum pVWex1 rhtB 0146* und den Referenzstamm

Bei Beteiligung von RhtB 0146 am Import der α -Ketosäuren, sollte die Überexpressionsmutante einen stärkeren Verbrauch der α -Ketosäuren aufweisen im Vergleich zum Referenzstamm. Bei beiden Stämmen war jedoch der Verbrauch der α -Ketosäuren ähnlich (s. Abb. 6.4.5.13). *C. glutamicum pVWex1 rhtB 0146* verbrauchte die α -Ketosäuren nicht schneller, sondern sogar etwas langsamer als der Referenzstamm.

Mit diesem Experiment konnte nicht gezeigt werden, ob RhtB 0146 am Import der α -Ketosäuren beteiligt war.

Um den Einfluss der rhtB-Überexpressionen auf den Export direkt zu untersuchen, wurden alle Plasmide zunächst in den $\Delta aceE \Delta ilvE$ -Hintergrund gebracht. Zusätzlich

Ergebnisse

wurden auch die Insertionen von *rhtB* 0146 und *rhtB* 2344 in diesen Hintergrund transferiert. Anschließend wurden Exportmessungen von KIV durchgeführt. Bezüglich KIV konnte kein Unterschied im Export zwischen den Mutanten und den Referenzstämmen festgestellt werden.

Demnach war keines der RhtB-Transportsysteme aus *C. glutamicum* am Export von KIV beteiligt.

Es stellte sich die Frage, ob eine Überexpression von *rhtC* aus *E. coli* in *C. glutamicum* zu einem erhöhten Export der α -Ketosäuren führen könnte. Dafür wurden zwei Überexpressionsplasmide basierend auf pEKex2 konstruiert. Im ersten Plasmid war nur *rhtC* und im zweiten Plasmid *rhtC* mit einem His-Tag am N-Terminus enthalten.

Zunächst wurde der Einfluss auf den Transport der α -Ketosäuren durch Beobachtung des Wachstums von *C. glutamicum* pEKex2 *rhtC*, *C. glutamicum* pEKex2 His-*rhtC* und *C. glutamicum* pEKex2 auf Gradientenplatten der α -Ketosäuren untersucht. Wenn RhtC am Export der α -Ketosäuren auch in *C. glutamicum* beteiligt wäre, dann sollten die Überexpressionsmutanten besser auf den Gradientenplatten wachsen können als der Referenzstamm. Bei KIL und KIC zeigten die Überexpressionsmutanten von *rhtC* ein geringfügig besseres Wachstum als der Referenzstamm (s. Abb. 6.4.5.14).

Diese geringfügige Wachstumsverbesserung deutete eine leichte Verbesserung des Exports von KIL und KIC durch die Überexpression von *rhtC* an. Daher wurden die Überexpressionsplasmide in den $\Delta aceE \Delta ilvE$ - und in den $\Delta ltbR \Delta ilvE$ -Hintergrund transferiert, um den Einfluss der Überexpression direkt auf den Export der α -Ketosäuren zu untersuchen.

Im $\Delta aceE \Delta ilvE$ -Hintergrund konnte wie erwartet kein Einfluss auf den Export von KIV durch die Überexpression von *rhtC* beobachtet werden. Für KIC konnte jedoch bei *C. glutamicum* pEKex2 *rhtC* zum ersten Mal im $\Delta aceE \Delta ilvE$ -Hintergrund (s. Abb. 6.4.5.15) ein deutlicher Anstieg der externen Konzentration vermerkt werden. Für die His-tag Variante von RhtC war dies jedoch nicht der Fall.

Ergebnisse

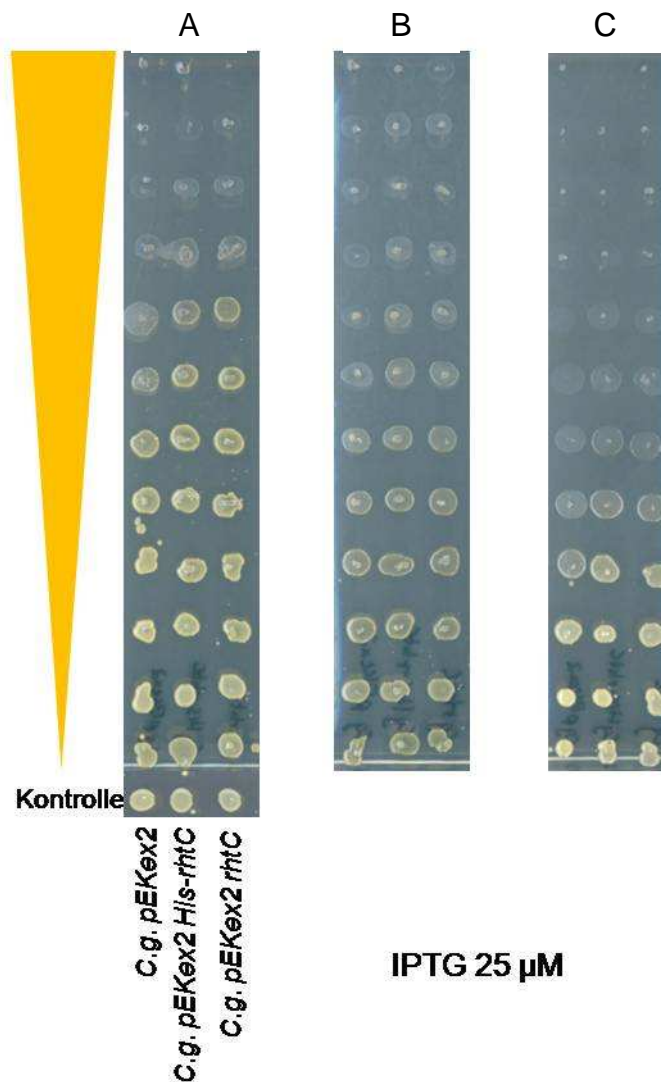


Abb. 6.4.5.14 Wachstum der *rhtC*-Überexpressionsmutanten aus *E. coli* in *C. glutamicum* sowie des Referenzstamms auf Gradientenplatten der α-Ketosäuren (A: KIL 0-40 mM; B: KIV 0-150 mM; C: KIC 0-50 mM)

Zur Überprüfung dieses Effektes wurde die Exportmessung von *C. glutamicum pEKex2*, *C. glutamicum pEKex2 rhtC* und *C. glutamicum pEKex2 His-rhtC* mit einer Dreifachbestimmung wiederholt. Es zeigte sich erneut, dass bei *C. glutamicum pEKex2 rhtC* eine externe Zunahme der KIC-Konzentration stattfand (s. Abb. 6.4.5.16). Bei der His-tag Variante konnte wieder kein erhöhter Export von KIC nachgewiesen werden, deshalb wurde diese Mutante in die nachfolgenden Versuche nicht mehr mit einbezogen.

Die Überexpression von *rhtC* führte zu einer sichtbaren Erhöhung des KIC-Exports im $\Delta aceE \Delta ilvE$ -Hintergrund.

Ergebnisse

Bei diesen Messungen befanden sich jedoch die gemessenen KIC-Konzentrationen sehr nah an der unteren Messgrenze der HPLC.

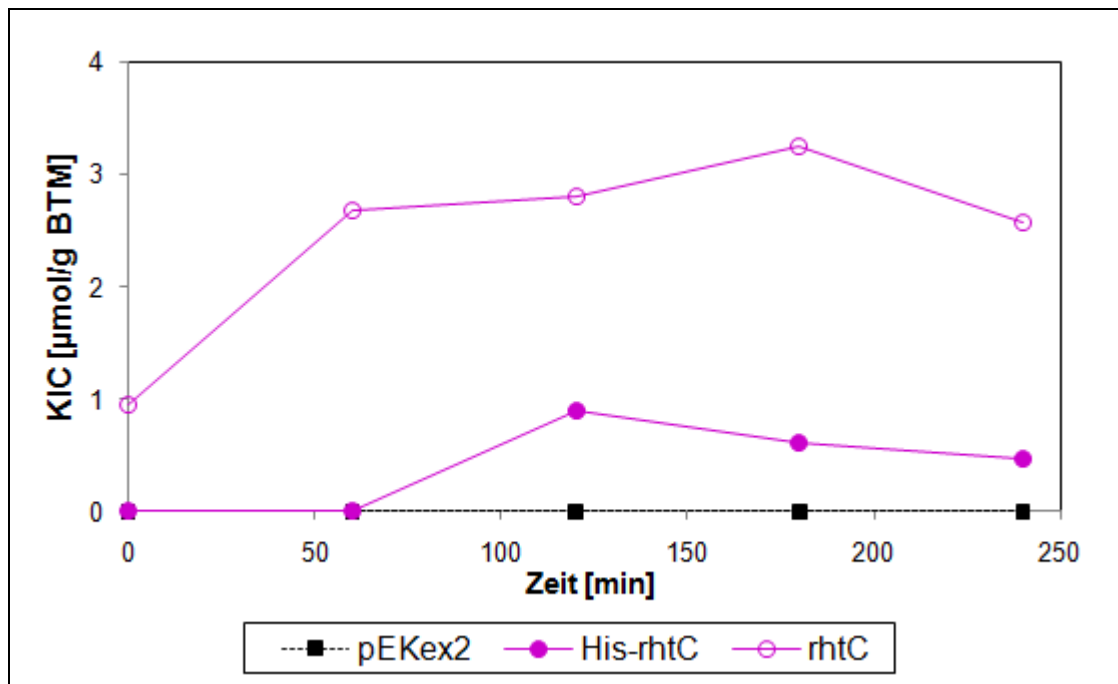


Abb. 6.4.5.15: Spezifische externe KIC-Konzentration der *rhtC*-Überexpressionsmutanten und der Referenzstämme

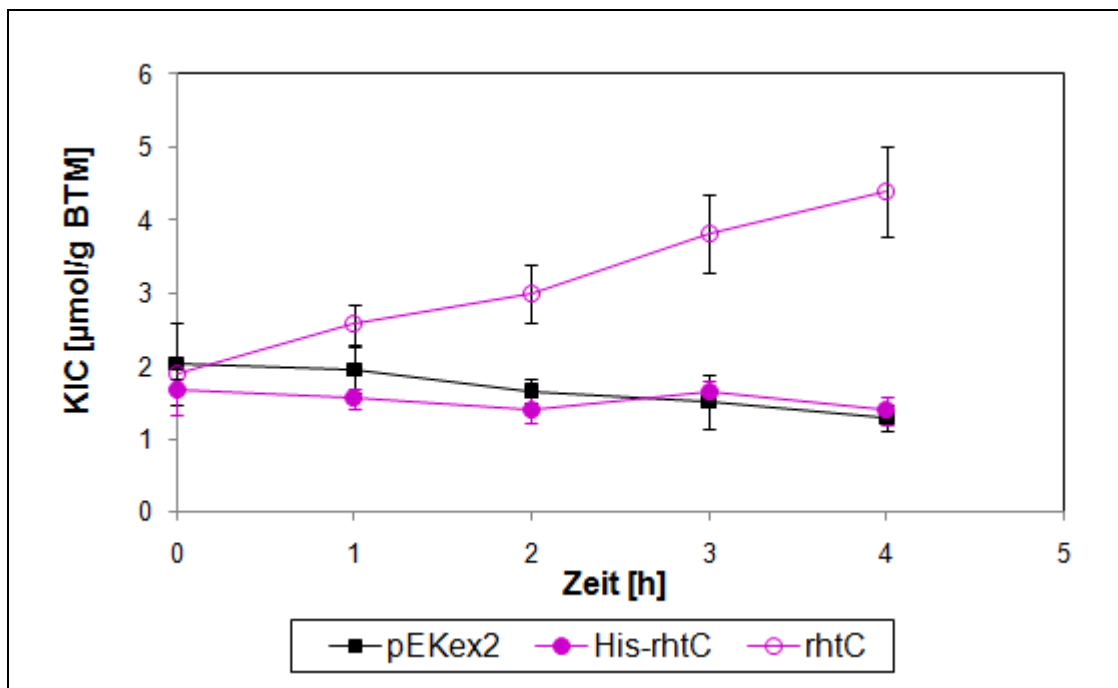
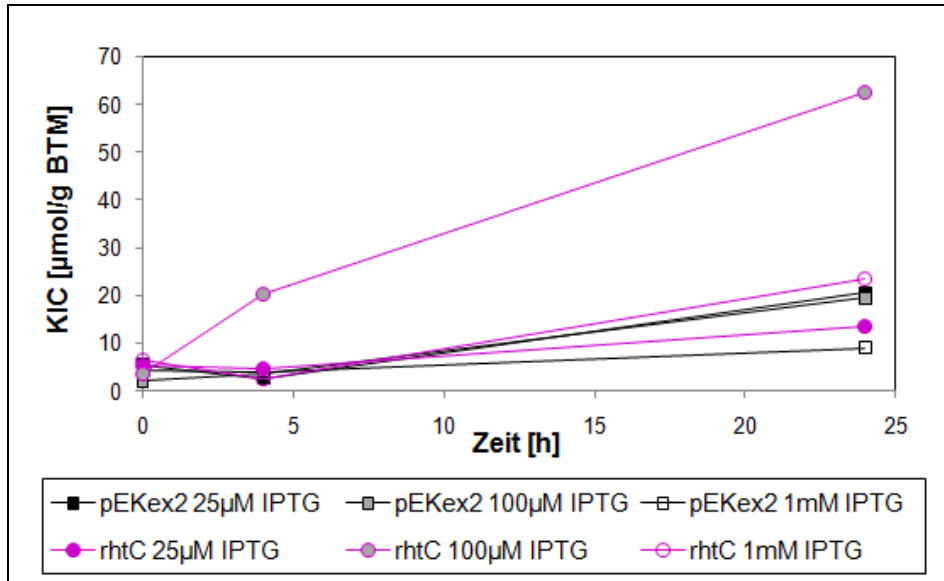


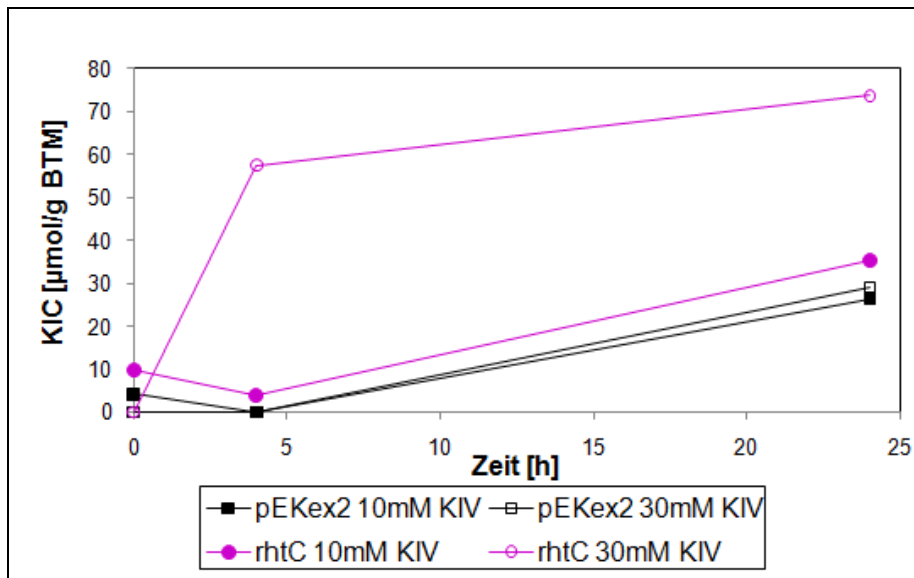
Abb. 6.4.5.16: Spezifische externe KIC-Konzentration der *rhtC*-Überexpressionsmutanten und des Referenzstamms in Dreifachbestimmung

Ergebnisse

A



B



C

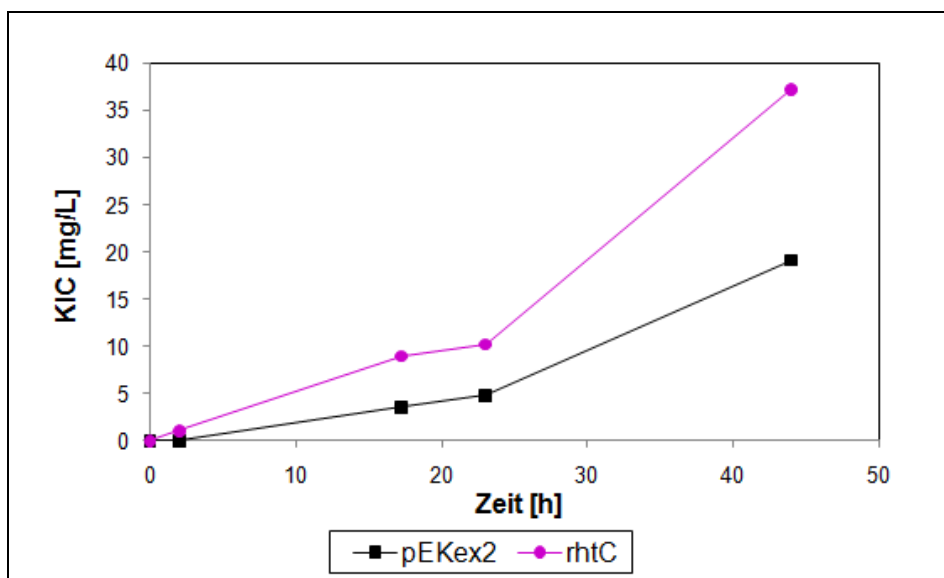


Abb. 6.4.5.17:

Darstellung der spezifischen externen KIC-Konzentration von *C. glutamicum* $\Delta aceE \Delta ilvE$ pEKex2 rhtC und des Referenzstamms mit Zugabe von unterschiedlichen IPTG-Konzentrationen (A), mit Zugabe von 10 oder 30 mM KIV (B) oder mit Zugabe von 100 μM IPTG und 30 mM KIV (C)

Ergebnisse

Deshalb wurde versucht durch die Erhöhung der IPTG-Konzentration oder durch die externe Zugabe von KIV den Export von KIC zu erhöhen. Da KIC aus KIV gebildet wird, sollte die Zugabe von KIV das Gleichgewicht zwischen KIV- und KIC-Produktion in Richtung der KIC-Produktion dirigieren und damit die KIC-Exkretion erhöhen. Als IPTG Konzentrationen wurden 25 μM , 100 μM und 1 mM getestet, wobei 100 μM IPTG die stärkste Erhöhung des KIC-Exportes auf ca. 60 $\mu\text{mol/g}$ BTM hervorrief (s. Abb. 6.4.5.17 A). An KIV wurden 10 mM oder 30 mM hinzugefügt. Bei 30 mM KIV wurde die höchste KIC-Konzentration mit ca. 70 $\mu\text{mol/g}$ BTM nach 24 h erreicht (s. Abb. 6.4.5.17 B). Anschließend wurden beide Kultivierungsbedingungen kombiniert und es konnte ein externe KIC-Konzentration von 39 mg/L oder 103 $\mu\text{mol/g}$ BTM erreicht werden (s. Abb. 6.4.5.17 C). Zwar konnte der Referenzstamm unter diesen Bedingungen auch eine KIC-Konzentration von 40 $\mu\text{mol/g}$ BTM erreichen, doch die Überexpression von *rhtC* führte zu einer 2,5 fachen Erhöhung des Ertrags.

Durch Veränderung der Kultivierungsbedingungen konnte der KIC-Export im $\Delta aceE \Delta ilvE$ -Hintergrund und in *C. glutamicum pEKex2 rhtC* erhöht werden.

Um den Export von KIC noch weiter zu erhöhen, war der Wechsel in den $\Delta ltbR \Delta ilvE$ -Hintergrund notwendig. In diesem Hintergrund war die Produktion von KIL und KIC deutlich höher als im $\Delta aceE \Delta ilvE$ -Hintergrund.

Ergebnisse

Daher wurden Exportmessungen von *C. glutamicum* $\Delta ltbR \Delta ilvE$ *pEKex2 rhtC* und dem Referenzstamm in 6-facher Bestimmung durchgeführt (s. Abb. 6.4.5.18). Es konnte jedoch im Durchschnitt nur eine geringfügige Verbesserung des KIC-Exports durch die Überexpression von *rhtC* im $\Delta ltbR \Delta ilvE$ -Hintergrund erreicht werden.

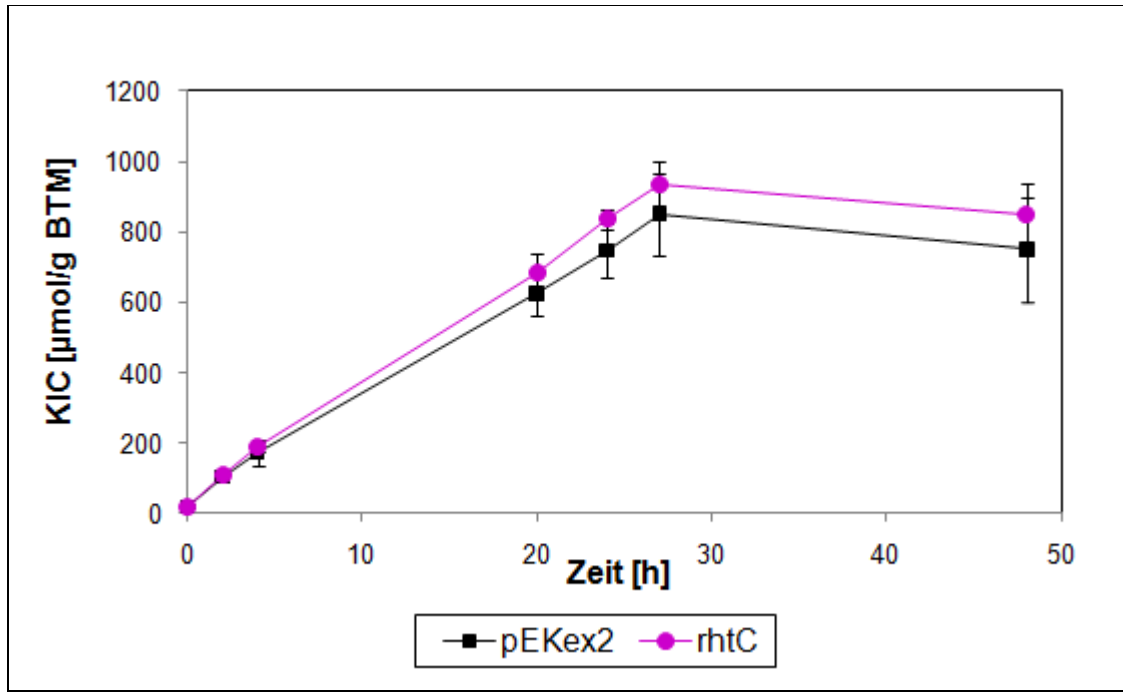


Abb. 6.4.5.18: Darstellung der spezifischen externen KIC-Konzentration von *C.g.* $\Delta ltbR \Delta ilvE$ *pEKex2 rhtC* und des Referenzstamms in 6-facher Bestimmung

7 Diskussion

7.1 *C. glutamicum* und *E. coli* sind sensitiv gegenüber den α -Ketosäuren KIL, KIV und KIC

Durch Wachstumsversuche in Mikrotiterplatten und auf Gradientenplatten der α -Ketosäuren konnte gezeigt werden, dass *C. glutamicum* und *E. coli* sensitiv gegenüber den α -Ketosäuren waren. Beide Organismen zeigten ein konzentrationsabhängiges Wachstum von den α -Ketosäuren. *E. coli* war deutlich sensitiver vor allem gegenüber KIV als *C. glutamicum*, obwohl bei *E. coli* K-12 Stämmen immerhin 2 der 3 Isoenzyme der AHAS (I und III) aktiv sind [Lawther *et al.* 1981]. *C. glutamicum* besitzt nur eine AHAS [Eggeling *et al.* 1987]. Die beiden *E. coli*-AHAS sind jedoch sensitiv gegenüber erhöhten Val-Konzentrationen [Lawther *et al.* 1981]. Dies könnte für KIV ebenso sein, was die erhöhte Sensitivität gegenüber KIV erklären würde. Die AHAS III wird zusätzlich noch durch Ile und Leu gehemmt, was die etwas höhere Sensitivität von *E. coli* gegenüber KIL und KIC erklären könnte. Ab welcher Konzentration kein Wachstum mehr vorhanden war, ist in Tab. 7.1.1 dargestellt.

Tab. 7.1.1 : Konzentration der α -Ketosäuren, bei denen eine vollständige Inhibition des Wachstums von *C. glutamicum* oder *E. coli* auf festem oder in flüssigem Medium auftrat

Organismus	Festes Medium			Flüssiges Medium		
	KIL	KIV	KIC	KIL	KIV	KIC
<i>C. glutamicum</i>	30 mM	70 mM	20 mM	25 mM	>50 mM	50 mM
<i>E. coli</i>	30 mM	20 μ M	4 mM	5 mM	10 μ M	100 μ M

Die Wachstumsinhibition gab erste Hinweise darauf, dass *C. glutamicum* und *E. coli* die α -Ketosäuren aufnahmen. Mit Hilfe von Verbrauchstest der α -Ketosäuren durch *C. glutamicum* konnte gezeigt werden, dass *C. glutamicum* die α -Ketosäuren tatsächlich aufnahm. Dies legte nahe, dass die Wachstumsinhibition von *C. glutamicum* durch die α -Ketosäuren von einem intrazellulären Effekt ausgelöst wurde. Diese Versuche zeigten, dass auch der Import der α -Ketosäuren eine wichtige Rolle bei einer Produktion der BCAA spielt, da eine erhöhte externe Konzentration der α -Ketosäuren, die z. B. durch Export der α -Ketosäuren entstanden war, zu einer Wachstumsinhibition des verwendeten Stammes führen kann.

Es war jedoch unklar, wie die α -Ketosäuren das Wachstum hemmten. Für die BCAA wurde gezeigt, dass eine erhöhte Konzentration jeweils einer BCAA ebenfalls zu einer Wachstumsinhibition führte, indem die Enzymaktivität der AHAS auf ca. 50% reduziert und dadurch ein Mangel an den beiden anderen BCAA ausgelöst wurde [Leyval *et al.* 2003]. Auf Grund der ähnlichen Struktur und dadurch, dass die AHAS als Schlüsselenzym des BCAA-Stoffwechsels betrachtet wird [Elišáková *et al.* 2005], wäre eine Hemmung der AHAS durch die α -Ketosäuren ebenfalls möglich. Wie bei den BCAA würde ein Mangel an den beiden anderen BCAA entstehen. Dass ein Mangel an BCAA beim Wachstum von *C. glutamicum* in Anwesenheit der α -Ketosäuren bestand, wurde gezeigt durch Wachstumsversuche von *C. glutamicum* in Anwesenheit der α -Ketosäuren mit Zugabe von 1 mM BCAA. Bei KIL und KIC konnte die Inhibition teilweise bei KIV sogar komplett durch die Zugabe der BCAA aufgehoben werden. In diesem Versuch wurde eine Mischung aller drei BCAA verwendet. Um zu testen, welche der BCAA genau für das Wachstum fehlte, wäre die Zugabe unterschiedlicher Mischungen von jeweils 2 BCAA oder die Zugabe auch nur einer BCAA notwendig gewesen. Um zu überprüfen, ob die α -Ketosäuren wirklich die Aktivität der AHAS hemmen, müsste die Enzymaktivität der AHAS in Anwesenheit jeweils einer α -Ketosäure gemessen werden. Dabei sollten auch Konzentrationen der α -Ketosäuren von ca. 50 mM eingesetzt werden, da die Messungen von internen KIV-Konzentrationen eines Stammes, der zur externen Anreicherung von KIV fähig war, bis zu 70 mM ergaben. Es sollten jedoch auch die anderen Enzyme des BCAA Stoffwechselweges untersucht werden, da auch diese durch die α -Ketosäuren gehemmt werden könnten.

Diese Enzymtests könnten ebenfalls zeigen, ob die Enzyme eine unterschiedliche Affinität zu den α -Ketosäuren aufweisen, was eine Erklärung für die unterschiedlichen Konzentrationen der α -Ketosäuren, die zur Wachstumsinhibition führten, sein könnte. Für die BCAA wurde bereits gezeigt, dass die Enzyme des BCAA-Stoffwechselweges unterschiedliche Affinitäten zu den BCAA aufweisen. Die Thr-Deaminase, welche Pyruvat und α -Ketobutyrat zu 2-Aceto-2-hydroxybutyrat verbindet, wird in *C. glutamicum* durch Ile und Leu gehemmt jedoch durch Val aktiviert [Pátek 2007]. Da KIV weniger hemmt als KIL oder KIC, könnte dies auch für die α -Ketosäuren der Fall sein.

Eine weitere Möglichkeit für die Wachstumsinhibition durch unterschiedliche Konzentrationen der α -Ketosäuren, könnte die unterschiedliche Affinität eines gemeinsamen Importers für die α -Ketosäuren sein. Es könnte jedoch auch

unterschiedliche Importer für die α -Ketosäuren mit verschiedenen Aufnahmeraten geben. Dass es einen Unterschied in der Aufnahme der α -Ketosäuren gibt wurde bei den Verbrauchstests der α -Ketosäuren durch *C. glutamicum* gezeigt. Jeweils 10 mM KIV oder KIC waren nach 24 h Kultivierung vollständig aufgebraucht. Von KIL waren jedoch noch ca. 5 mM vorhanden. KIL wurde deutlich langsamer aufgenommen als KIV oder KIC.

7.2 Der Importer BrnQ und der Exporter BrnFE der BCAA sind nicht für den Transport der α -Ketosäuren verantwortlich

Der Transport der BCAA wurde bereits gut untersucht. Über die Transporter der direkten Vorstufen, der α -Ketosäuren, ist jedoch nichts bekannt.

Nachdem gezeigt wurde, dass die α -Ketosäuren von *C. glutamicum* aufgenommen wurden, kam als erster potentieller Kandidat BrnQ, der Importer für die BCAA, in Frage [Tauch *et al.* 1998]. Durch Aufnahmemessungen von ^{14}C -Ile in Anwesenheit einer α -Ketosäure und durch Wachstumstest einer *brnQ*-Insertionsmutante in Anwesenheit jeweils einer α -Ketosäure konnte gezeigt werden, dass BrnQ nicht am Import der α -Ketosäuren beteiligt war. Daher musste weiter nach Importern für die α -Ketosäuren gesucht werden.

Es war unklar, ob *C. glutamicum* die α -Ketosäuren wie die BCAA exportieren würde. Durch die Deletion von *aceE*, das Gen für eine Untereinheit der Pyruvatdehydrogenase, und *ilvE*, das Gen der BCAA-Transaminase,] wurde ein Stamm mit einer erhöhten KIV-Biosynthese erzeugt [AG Eikmanns, Uni Ulm. Bei diesem Stamm konnte Innerhalb von 3 h eine externe Anreicherung von KIV gemessen werden. Derselbe Effekt konnte durch die Deletion von *ltbR*, welches einen Regulators der *leu*-Gene kodiert, und *ilvE* für KIL und KIC erreicht werden [AG Eikmanns, Uni Ulm]. Um allerdings einen vergleichbare spezifische Konzentration, bezogen auf die Biomasse, von KIL und KIC im $\Delta ltbR \Delta ilvE$ -Hintergrund zu KIV im $\Delta aceE \Delta ilvE$ -Hintergrund zu erreichen, musste die Messdauer auf 20 h erhöht werden.

Wie BrnQ für den Import war BrnFE, der Exporter der BCAA], der erste Kandidat für den Export der α -Ketosäuren [Kennerknecht *et al.* 2002. Die Deletion [AG Eikmanns, Uni Ulm] und die Überexpression [Trötschel 2005] von BrnFE wurden in den $\Delta aceE \Delta ilvE$ -Hintergrund gebracht und der Export von KIV gemessen. Die gemessene Exportrate setzte sich jedoch aus Export und gleichzeitigem Import von KIV zusammen. Es konnte

jedoch nur eine geringe Reduktion der gemessenen Exportrate durch die Deletion und eine geringe Erhöhung durch die Überexpression beobachtet werden. Daher war BrnFE entweder nicht oder zumindest nicht als Hauptsystem am Export von KIV beteiligt. Nachdem der Exportmechanismus für KIV als nicht sekundär aktiv ermittelt worden war, war die fehlende Beteiligung von BrnFE am Export von KIV nicht mehr überraschend, da BrnFE ein Protonen-Antiporter und daher sekundär aktiv ist [Kennerknecht *et al.* 2002].

Wie beim Import schloss sich auch für den Export eine Suche nach potentiellen Kandidaten an.

7.3 Die Sensitivität von *C. glutamicum* gegenüber den α -Ketosäuren kann zur Suche nach Importern genutzt werden

Die Sensitivität von *C. glutamicum* gegenüber den α -Ketosäuren bei Wachstum auf festem oder in flüssigem Medium konnte nun zum Screening nach Importern verwendet werden. Dieses Screening war jedoch nur möglich, wenn jede α -Ketosäure nur über einen Importer oder über ein Hauptimportsystem aufgenommen werden würde. Bei redundanten Systemen, wäre das Screening nicht erfolgversprechend.

Eine Möglichkeit stellte das Screening von Mutanten, die durch gerichtete Mutagenese entstanden waren, in Flüssigmedium dar. Dabei wurden jeweils ein Kandidat für KIC und KIV und vier Kandidaten für KIL identifiziert. Die Kandidaten sind in Tab. 7.3.1 mit der zugehörigen Transporterfamilie und der vorhergesagten Funktion dargestellt. Außer für Cgl2327 konnten für die anderen Kandidaten auch vergleichbare Proteine mit einer Übereinstimmung der Aminosäuresequenz von 24-32% in *E. coli* gefunden werden. Für diese Proteine wurden ähnliche Funktionen vorhergesagt wie für die Proteine aus *C. glutamicum*. Von den Proteinen aus *C. glutamicum* wurde noch keines charakterisiert. Die vergleichbaren Proteine zu Cgl0267 und Cgl1082 wurden schon bezüglich ihrer Funktion untersucht (s. Tab. 7.3.1). Die gefundenen Kandidaten sollten anschließend weiter untersucht werden. Das Wachstum der Kandidaten sollte auch auf Gradientenplatten der α -Ketosäuren untersucht werden, da eine Insertionsmutante für einen putativen Exporter schon unterschiedliches Wachstum auf festem und in flüssigem Medium in Anwesenheit der α -Ketosäuren gezeigt hatte. Auf festem Medium war eine deutliche Sensitivität gegenüber den α -Ketosäuren sichtbar. In flüssigem Medium war die Sensitivität komplett verschwunden und die Mutante wuchs wie *C.*

Diskussion

glutamicum. Um den Effekt der Insertion auf das Wachstum der Kandidaten auch bei höheren Biomassekonzentrationen zu untersuchen, würden sich Sensitivitätstest mit den Mutanten in Schüttelkolben anbieten. Die Mutanten, die auch in Schüttelkolben besseres Wachstum auf den α -Ketosäuren aufweisen, sollten zu Verbrauchstest der α -Ketosäuren herangezogen werden. Sollte tatsächlich ein Importer ausgeschaltet worden sein, müssten diese Mutanten einen deutlich geringeren Verbrauch der α -Ketosäuren im Vergleich zu *C. glutamicum* aufweisen. Um die Aufnahme der α -Ketosäuren direkt zu messen, könnten anschließend auch Aufnahmemessungen mit ^{14}C -markierten α -Ketosäuren mit den Mutanten durchgeführt werden.

Tab. 7.3.1: Kandidaten für den Import der α -Ketosäuren mit Vorhersage der Funktion, zugehöriger Transporterfamilie sowie vergleichbare Proteine in *E. coli* mit Vorhersage der Funktion

α -Ketosäure	Gen	Vorhergesagte Funktion	Transporterfamilie	Vergleichbares Protein in <i>E. coli</i> (Identität)	Vorhergesagte Funktion
KIL	<i>cgl0267</i>	Formate hydrogenlyase subunit 3/Multisubunit Na^+/H^+ antiporter, MnhD subunit	CPA3	HyfB (26%)	Hydrogenase 4, component B [Andrews <i>et al.</i> 1997]
	<i>cgl1502</i>	Permeases of the major facilitator superfamily	MFS	YidY (24%)	Drug MFS transporter
	<i>cgl2327</i>	Predicted Na^+ -dependent transporter	BASS	-	-
	<i>cgl2551</i>	Na^+/H^+ -dicarboxylate symporters	DAACS	YdjN (31%)	Predicted transporter
KIV	<i>cgl1082</i>	$\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ antiporter	CaCA	ChaA (32%)	Calcium/sodium:proton antiporter [Ivey <i>et al.</i> 1993]
KIC	<i>cgl2551</i>	Na^+/H^+ -dicarboxylate symporters	DAACS	YdjN (31%)	Predicted transporter

BASS: Bile Acid: Na^+ Symporter; CaCA: Ca^{2+} :Cation Antiporter; CPA3: FamilyMonovalent Cation (K^+ or Na^+):Proton Antiporter-3; DAACS: Dicarboxylate/Amino Acid:Cation (Na^+ or H^+) Symporter; MFS: Major Facilitator Superfamily; (Blast: www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi)

Diskussion

Mit einem ähnlichen Ansatz wurde schon der Importer für aromatische Aminosäuren in *E. coli* gefunden. Dabei zeigten Mutanten, die ein mutiertes *aroP*-Gen besaßen, Wachstum auf 5-Methyltryptophan, ein Trp-Analogon, welches für *E. coli* normalerweise toxisch ist [Brown 1970].

Im parallelen Ansatz wurde als weitere Möglichkeit ein Screening von Mutanten einer Transposonbank, die durch ungerichtete Mutagenese erstellt worden war, durchgeführt. Zuvor wurden Parameter für ein weitestgehend automatisiertes Screening ermittelt. Es wurde eine geeignete Animpftechnik gefunden, die Konzentrationen der α -Ketosäuren ermittelt, bei denen nur noch maximal 1-2 Mutanten pro Agarplatte wachsen konnten, und die Medien für die Vorkultivierung definiert.

Bei der Bestimmung der α -Ketosäurekonzentrationen wurde jedoch auch die Bildung von Spontanmutanten beobachtet, die bei höheren Konzentrationen wachsen konnten als *C. glutamicum*. Bei *C. glutamicum* geschah dies nach ca. 1,5 Tagen. Dieser Effekt sollte beim Screening von Mutanten berücksichtigt werden. Die Spontanmutanten zeigten jedoch nur Unterschiede bezüglich des Stoffwechsels der α -Ketosäuren und nicht in Bezug auf den Transport. Die AHAS oder die AHAIIR waren nicht von der Mutation betroffen, da dies durch Sequenzierung der Gene *ilvBNC* überprüft worden war. Da die Spontanmutanten Kometabolisierung von Glukose und den α -Ketosäuren zeigten, könnte bei ihnen eine erhöhte Expression von *ilvE* vorhanden gewesen sein, wodurch die α -Ketosäuren schneller in die BCAA umgewandelt und verstoffwechselt werden konnten. Über den Abbau der α -Ketosäuren ist jedoch weiter nichts bekannt. Auch bei *E. coli* konnte die Bildung von Spontanmutanten beobachtet werden. Dies geschah bereits nach 0,5 Tagen. Beim Screening von *E. coli* Mutanten sollte demnach noch genauer auf Sekundärmutationen geachtet werden. Bei den Spontanmutanten, die auf KIV-Gradientenplatten entstanden waren, schien sogar ein KIV-Importer betroffen zu sein, da sie bei jeder KIV-Konzentration vergleichbares Wachstum zur Kontrolle auf Glukose zeigten. Bezüglich der Transporter für die α -Ketosäuren in *E. coli*, sollten diese Spontanmutanten weiter untersucht werden.

Mit den definierten Parametern wurde das Screening der Transposonbank von einem Kooperationspartner durchgeführt. Es konnten jedoch keine Kandidaten identifiziert werden, bei denen Transporter betroffen waren.

Beim Screening nach Exportern (s. 7.5) zeigte die Überexpressionsmutante von *rhtB 0146* ein deutlich schlechteres Wachstum in Anwesenheit von allen drei α -Ketosäuren.

Dies deutet darauf hin, dass RhtB 0146 am Import der α -Ketosäuren beteiligt ist. Durch Verbrauchstest konnte dies jedoch nicht bestätigt werden. Die Insertionsmutante von RhtB 0146 wuchs nur geringfügig besser als *C. glutamicum* in Anwesenheit der α -Ketosäuren. Dies deutete auf einen zweiten Importer der α -Ketosäuren hin. Um zu untersuchen, ob RhtB 0146 wirklich am Import der α -Ketosäuren beteiligt ist, müssten Aufnahmemessungen von ^{14}C -markierten α -Ketosäuren durchgeführt werden. Dabei könnte auch der Importmechanismus des zweiten putativen Importers ermittelt werden.

7.4 Das Transportsystem, welches durch die Gene *cgI1687-88* kodiert wird, ist ein putativer Exporter für die α -Ketosäuren

Durch Analyse des Exportmechanismus von KIV wurden die sekundär aktiven Transporter als Exporter für KIV ausgeschlossen.

Es war ungewöhnlich, dass KIV über einen primär aktiven Transporter exportiert werden sollte, da die meisten Aminosäure-Exporter in *C. glutamicum* und *E. coli* sekundär aktiv sind [Marin und Krämer 2007]. Doch wie GluABCD die Ausnahme bei den Importern in *C. glutamicum* bildet, so gibt es auch einen primär aktiven Exporter für Cys in *E. coli*, CydDC [Pittman *et al.* 2002]. Daher wurde ein Screening von putativen ABC-Exportern auf Gradientenplatten der α -Ketosäuren durchgeführt. Dabei wurde die Insertionsmutante von *cgI1688* durch deutlich schlechteres Wachstum bei allen drei α -Ketosäuren auffällig.

Der putative ABC-Exporter wird durch die Gene *cgI1687* und *cgI1688* kodiert. Die Strukturvorhersage von Cgl1687 enthielt keine Transmembrandomänen und es wurde eine Funktion als ATPase vorhergesagt. Cgl1688 sollte laut Vorhersage 6 Transmembrandomänen und eine Funktion als Permease besitzen. In Abb. 7.4.1 ist eine schematische Darstellung der putativen Struktur von Cgl1687-88 zu sehen.

CydDC aus *E. coli* wird auch von zwei Genen kodiert. Allerdings wurde die Struktur von CydDC als Heterodimer beschrieben. Bei diesem ABC-Exporter besitzen CydD und CydC jeweils 6 Transmembrandomänen und eine ATP-Bindekassette [Cruz-Ramos *et al.* 2004]. Jedes der Proteine besitzt demnach die Funktion als ATPase und als Permease.

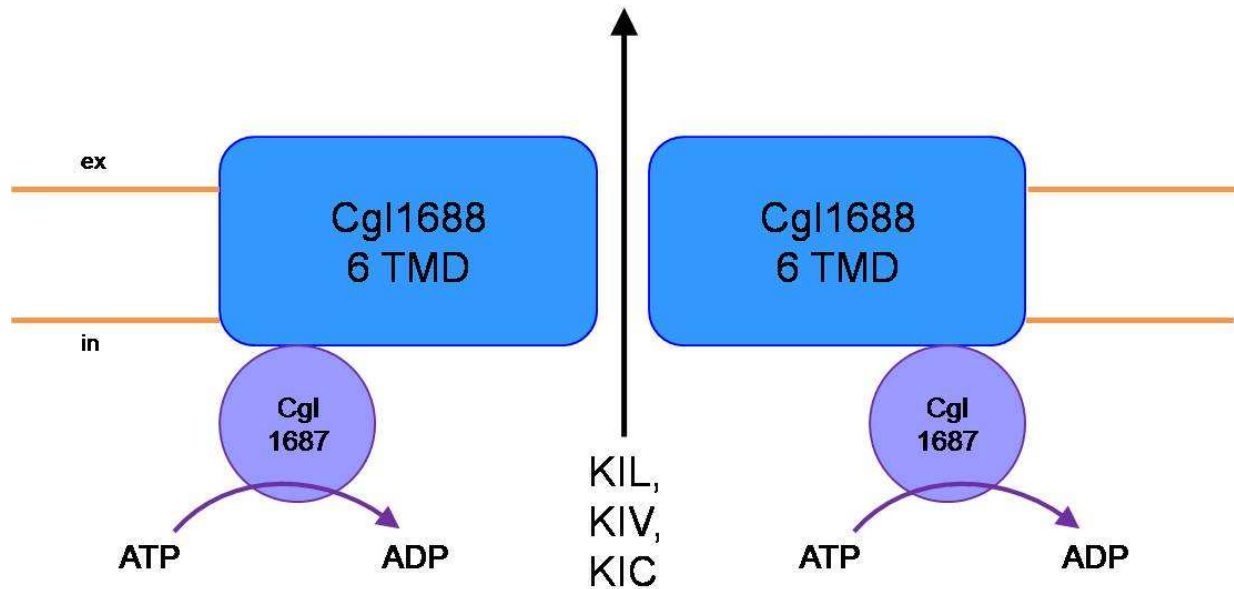


Abb. 7.4.1: Schematische Darstellung des ABC-Exporters Cgl1687-88 für die α -Ketosäuren mit Vorhersage der Transmembrandomänen und der Funktion als ATPase und Permease.

In anderen Organismen sind ABC-Transporter weit verbreitet. Im Menschen transportieren ABC-Transporter unterschiedliche Substanzen. Der erste ABC-Transporter, der identifiziert wurde ist Mrp1 (multidrug resistance-related protein 1 oder ABCC1) [Cole *et al.* 1992]. Mrp1 ist nur ein Protein mit ca. 1500 Aminosäuren, dass jedoch 2 Hälften mit jeweils einer ATP-Bindecassette und mehreren Transmembrandomänen besitzt [Cole *et al.* 1993]. Mrp1 ist im Schutz von Zellen gegen Xenobiotika und im Transport von Hormonen involviert [Hodorova *et al.* 2004].

Beim Wachstum der *cgl1688*-Insertionsmutante traten jedoch überraschenderweise Unterschiede auf festem und in flüssigem Medium auf. Auf festem Medium zeigte die Mutante eine deutlich erhöhte Sensitivität gegenüber den α -Ketosäuren. In flüssigem Medium war das Wachstum der Mutante jedoch vergleichbar zum Referenzstamm. Es könnte sein, dass beim Wachstum in flüssigem Medium noch ein zweiter Exporter für die α -Ketosäuren aktiv ist und den Export beim Fehlen von Cgl1687-88 vollständig übernimmt. Cgl1687-88 könnte auch ein Exporter für ein toxisches Stoffwechselprodukt sein, das nur bei Wachstum auf festem Medium entsteht, und kein Exporter für die α -Ketosäuren. Eine andere Möglichkeit wäre, dass die unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen wie z.B. Sauerstoffversorgung oder Homogenität des Mediums diesen Effekt hervorriefen.

Zur direkten Untersuchung des Einflusses von Cgl1687-88 auf den Export der α -Ketosäuren wurden die beiden Gene in den Stämmen, die die α -Ketosäuren extern anreichern konnten, überexprimiert. Es konnte jedoch nur eine Erhöhung des Exports aller drei α -Ketosäuren gemessen werden, wenn der native Promotor im Plasmid und sehr wenig IPTG während der Messung vorhanden waren. Ein Grund für das notwendige Vorhandensein des nativen Promotors könnte das Fehlen einer Signalsequenz zum Einbau des Transporters in die Membran in Abwesenheit des nativen Promotors sein. Um zu überprüfen, ob Cgl1687-88 wirklich am Export der α -Ketosäuren beteiligt ist, sollte die Exportmessung ohne die Zugabe von IPTG durchgeführt werden. Eine andere Möglichkeit wäre die Durchführung von „pulse-chase“-Experimenten mit ^{14}C -markierten α -Ketosäuren. Es wäre auch möglich die α -Ketosäuren intern zu labeln, indem die Zellen mit ^{14}C -markierten Vorstufen der α -Ketosäuren, wie z.B. ^{14}C -Pyruvat, gefüttert werden, um dann nach einem Waschschrift den Export zu messen. Die bisher durchgeführten Exportmessungen deuteten jedoch darauf hin, dass Cgl1687-88 am Export aller drei α -Ketosäuren beteiligt ist.

Durch Westernblotanalyse von Zellaufschlüssen der beiden Stämme, die die α -Ketosäuren anreichern, mit der Überexpression von *cgl1687-88-Strep* konnte gezeigt werden, dass die Expression sehr schwach war. Demnach könnte die Expression noch optimiert werden, z.B. durch die Verwendung eines anderen Überexpressionsplasmides. Eine Veränderung des Promotors könnte jedoch zum Verlust der Expression führen.

7.5 RhtC aus *E. coli* ist ein putativer Exporter für KIC in *C. glutamicum*

Einen zweiten parallelen Ansatz zur Identifikation eines Exporters für die α -Ketosäuren stellte ein möglicher Vergleich mit *E.coli* und dadurch das Screening einer *E. coli* Genbank dar. Da *E. coli* eine deutlich höhere Sensitivität gegenüber den α -Ketosäuren zeigte als *C. glutamicum*, konnten beim Screening von *E. coli*-Mutanten niedrigere Konzentrationen der α -Ketosäuren eingesetzt werden. Durch die Überexpression von Exportergenen für die α -Ketosäuren sollten diese Mutanten in Anwesenheit von inhibierenden Konzentrationen der α -Ketosäuren wachsen können.

Für KIL konnten keine Gene identifiziert werden, die im Zusammenhang mit dem Stoffwechsel der BCAA oder mit Transportern standen. In wie weit die identifizierten

Gene im Zusammenhang mit einem besseren Wachstum in Anwesenheit von KIL standen war jedoch nicht bekannt.

Bei den identifizierten Inserts für KIV waren immer die Gene *ilvI* und *ilvH* enthalten, die die AHAS III in *E.coli* kodierten. In *E. coli* wird die AHAS III durch Val gehemmt [Lawther *et al.* 1981]. Dies ist wahrscheinlich auch für KIV der Fall. Eine Überexpression der AHAS III-Gene würde demnach die Menge an AHAS III erhöhen und die vorhandene Konzentration an KIV würde nicht mehr ausreichen, um einen Mangel der beiden anderen BCAA aus zu lösen. In allen Inserts war allerdings auch das Gen *leuO* enthalten, welches einen Aktivator des *leuABCD*-Operons kodiert [Chen *et al.* 2000]. Durch eine erhöhte Expression der *leuABCD*-Gene würde KIV schneller in KIC umgewandelt werden und könnte die AHAS nicht mehr hemmen. Es war demnach nicht eindeutig klar, ob nur die Überexpression von *ilvI* und *ilvH* zu einem Wachstum auf einer inhibierenden KIV-Konzentration führte, oder ob auch die Überexpression von *leuO* daran beteiligt war. Die drei Gene könnten in einem Operon organisiert sein, da die Gene sehr nah aneinander lokalisiert sind. Dann wäre die Anwesenheit von *leuO* und dem Promotorbereich vor *leuO* notwendig, damit *ilvI* und *ilvH* exprimiert werden würden. Auch in *C. glutamicum* gibt es einen Regulator der *leu*-Gene, LtbR, der jedoch die Gene *leuC/D* und *leuB* reprimiert. Beide Regulatoren weisen eine Identität der Aminosäuresequenz von nur 13,4% auf. Es wurde untersucht, ob eine Deletion von *ltbR* in *C. glutamicum* eine vergleichbare Wirkung hervorrufen würde, wie eine Überexpression von *leuO* in *E. coli*. Dies war jedoch nicht so. Da LtbR jedoch auch andere Gene reguliert [Kalinowski *et al.* 2007], sollten die weiteren Targets bezüglich des Zusammenhangs mit dem BCAA-Stoffwechsel untersucht werden.

In einem Insert bei KIC waren die Gene *creA-D* enthalten. Die Gene *creB/C* kodieren einen globalen Regulator, der nur bei Wachstum auf Minimalmedium aktiv ist [Avison *et al.* 2001]. Da das Screening der Genbank auf Minimalmedium-Agarplatten durchgeführt wurde, stellt die Überexpression von *creB/C* eine zu erwartende Möglichkeit dar, um das Wachstum auf Minimalmedium zu verbessern, da sich die Zellen mit der Überexpression von *creABCD* schneller an das Wachstum auf Minimalmedium anpassen konnten.

In den beiden anderen sequenzierten Inserts war das Gen *rhtC* enthalten, welches einen Thr-Exporter kodiert [Zakataeva *et al.* 1999]. Durch Retransformation der Plasmide wurde gezeigt, dass die Überexpression von *rhtC* und nicht eine

Sekundärmutation für das verbesserte Wachstum in Anwesenheit von KIC verantwortlich war. RhtC gehört zu der RhtB-Transporterfamilie (rht: resistant to homoserine and threonine) [Zakataeva *et al.* 1999] und besitzt 6 Transmembrandomänen. Als Transportmechanismus wird der Antiport von Thr und H⁺ vorhergesagt [web 5]. Das Gen *rhtC* wurde bereits erfolgreich in *C. glutamicum* überexprimiert und führte zu einem erhöhten Thr-Export in einem Thr-Produzenten [Diesveld *et al.* 2009]. Der erste Vertreter der RhtB-Familie war RhtB aus *E. coli*. Die Überexpression von *rhtB* vermittelte eine Resistenz gegenüber Homoserin und Homoserin Lakton. Die RhtB-Familie ist in vielen Eubakterien und Archaeen vertreten und meistens wird die Funktion als Membranprotein vorhergesagt [Zakataeva *et al.* 1999]. In *C. glutamicum* gibt es drei putative Transporter, Cgl0146 (RhtB 0146), Cgl2344 (RhtB 2344) und Cgl2656 (RhtB 2656), die auch dieser Transporterfamilie zugeordnet werden. Auch in anderen Corynebakterien gibt es Vertreter der RhtB-Familie (s. Abb. 7.5.1). Die RhtB-Proteine aus den Corynebakterien weisen jedoch keine strukturelle Ähnlichkeit mit RhtC auf, was bei der sehr entfernten Verwandtschaft von *C. glutamicum* und *E. coli* nicht überraschend ist. Die RhtB-Proteine aus den Corynebakterien können in drei strukturell verwandte Gruppen, RhtB1 für RhtB 0146, RhtB2 für RhtB 2344 und RhtB3 für RhtB 2656, eingeteilt werden, die auf der Verwandtschaft zu den drei RhtB-Vertretern aus *C. glutamicum* beruhen. In wie weit jedoch die Funktion der Proteine RhtC, RhtB 0146, RhtB 2344 und RhtB 2656 Ähnlichkeiten aufwiesen wurde durch Wachstumsversuche von Insertionsmutanten und Exportmessungen von Überexpressionsmutanten untersucht. Keines der RhtB-Proteine aus *C. glutamicum* war jedoch am Export der α -Ketosäuren beteiligt.

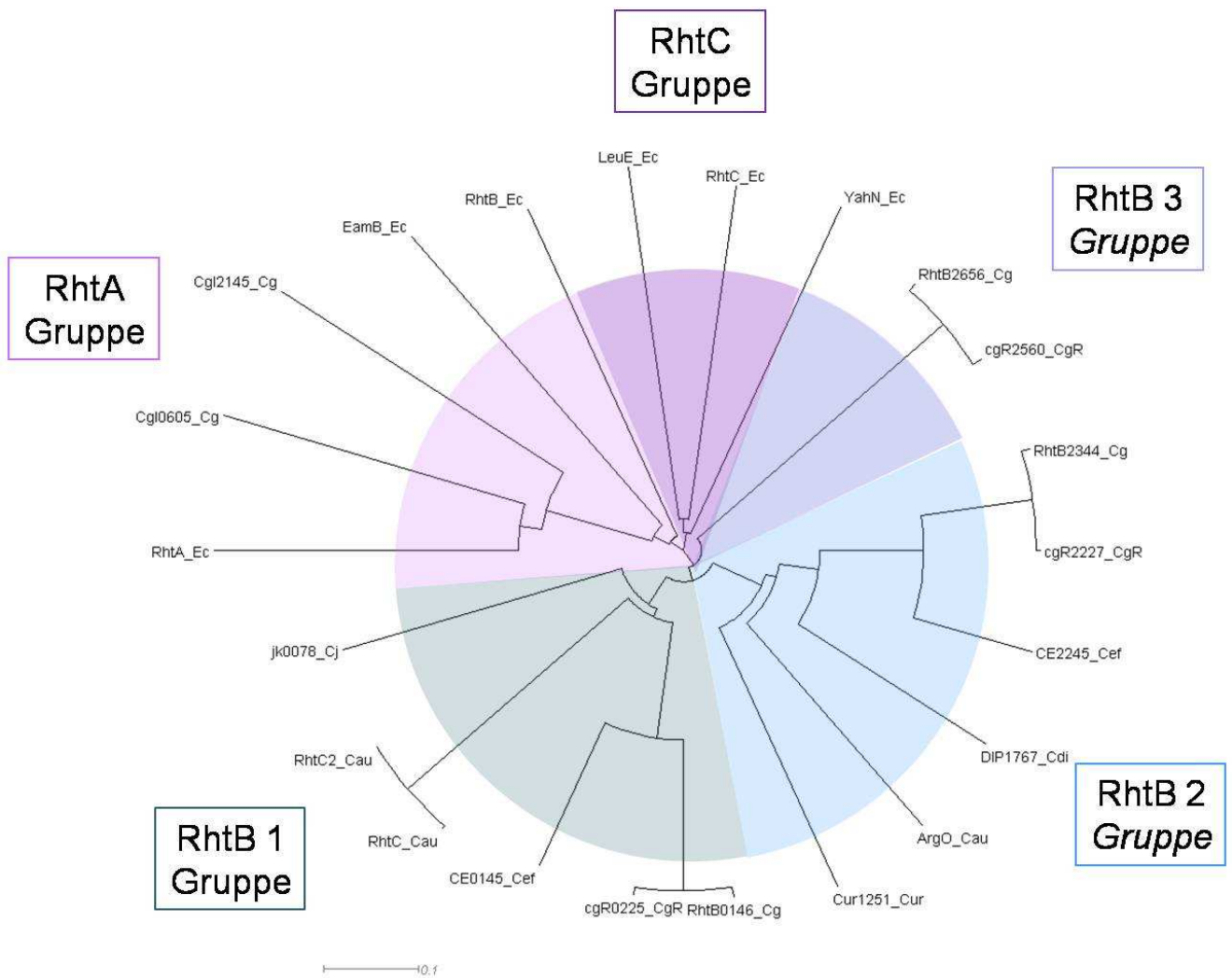


Abb. 7.5.1: Darstellung der Verwandtschaft und Einteilung in Gruppen von RhtC aus *E. coli*, RhtB 0146, RhtB 2344 und RhtB 2656 aus *C. glutamicum* und von weiteren RhtB-Proteinen aus *E. coli* (Ec), *C. glutamicum* ATCC 13032 (Cg), *C. glutamicum* R (CgR), *Corynebacterium aurimucosum* ATCC 700975, *Corynebacterium diphtheriae* NCTC 13129 (Cdi), *Corynebacterium efficiens* YS-314 (Cef), *Corynebacterium jeikeium* K411 (Cj), *Corynebacterium urealyticum* DSM 7109 (Cur)

Die Überexpression von *rhtC* in *C. glutamicum* konnte jedoch den Export von KIC leicht verbessern. Der Hauptbestandteil des Exports wurde allerdings bereits vom in *C. glutamicum* vorhandenen Exporter übernommen, welcher Cgl1687-88 sein könnte. Bezogen auf eine putative zukünftige Produktion der α -Ketosäuren wäre es sinnvoller die Beteiligung von Cgl1687-88 am Export der α -Ketosäuren zu untersuchen als die Beteiligung von RhtC.

8 Zusammenfassung

Für die beiden bekanntesten Aminosäureproduzenten *C. glutamicum* und *E. coli* sind die Stoffwechselwege und die Transportwege der verzweigtkettigen Aminosäuren (BCAA) bereits gut untersucht worden. Über den Transport der Vorstufen ist jedoch nichts bekannt. Der Transport der α -Ketosäuren sollte besonders in *C. glutamicum* untersucht werden.

Sowohl *C. glutamicum* als auch *E. coli* zeigten eine konzentrationsabhängige Sensitivität gegenüber den α -Ketosäuren. *E. coli* war jedoch deutlich sensibler gegenüber den α -Ketosäuren als *C. glutamicum*, was vermutlich an der unterschiedlichen Sensitivität der Enzyme des BCAA-Stoffwechsels in *E. coli* im Vergleich zu *C. glutamicum* lag. Für *C. glutamicum* konnte mit Hilfe von Verbrauchstest die Aufnahme der α -Ketosäuren nachgewiesen werden.

Nachdem BrnQ, der Importer der BCAA, als Importer für die α -Ketosäuren in *C. glutamicum* ausgeschlossen werden konnte, wurde die Sensitivität von *C. glutamicum* gegenüber den α -Ketosäuren zur Suche nach Importern für die α -Ketosäuren genutzt. Beim Screening musste jedoch auf die Bildung von Sekundärmutationen geachtet werden, da dies bei *C. glutamicum* nach 1,5 Tagen und bei *E. coli* sogar nach 0,5 Tagen Inkubation auf den α -Ketosäuren der Fall war. Beim Screening von Mutanten, die durch gerichtete Mutagenese erstellt worden waren, konnte jeweils ein Kandidat für KIV und KIC und 4 Kandidaten für KIL identifiziert werden. Für fünf der Kandidaten konnten auch vergleichbare Proteine in *E. coli* gefunden werden, die eine Übereinstimmung der Aminosäuresequenz von bis zu 32% aufwiesen.

Beim Screening einer *C. glutamicum* Transposonbank konnten keine Kandidaten für den Import der α -Ketosäuren identifiziert werden. Bei Wachstumstest von Insertionsmutanten der RhtB-Transporter in *C. glutamicum*, zeigte die Insertionsmutante von *rhtB 0146* deutlich schlechteres Wachstum. RhtB 0146 schien daher am Import der α -Ketosäuren beteiligt zu sein.

Bezüglich des Exports der α -Ketosäuren konnte BrnFE, der Exporter der BCAA, ausgeschlossen werden. Dies wurde noch durch die Bestimmung des Exportmechanismus von KIV als nicht sekundär aktiv unterstützt. Daher wurden Insertionsmutanten von (putativen) ABC-Exportern bezüglich des Wachstums auf den α -Ketosäuren analysiert. Dabei wurde die Mutante mit der Insertion in *cgl1688* auffällig.

Zusammenfassung

Bei Exportmessungen der Überexpressionsmutante in den $\Delta aceE$ $\Delta ilvE$ - oder $\Delta ltbR$ $\Delta ilvE$ -Hintergründen, die eine Exkretion der α -Ketosäuren zeigten, konnte eine Erhöhung des Exports aller 3 α -Ketosäuren beobachtet werden, wenn der native Promotor für *cgl1687-88* im Überexpressionsplasmid vorhanden war.

Das Screening einer *E. coli* Genbank zeigte, dass die Überexpression von *rhtC*, einem bekannten Exporter für Threonin, zu besserem Wachstum in Anwesenheit von KIC führte. Die Überexpression von Vertretern derselben Transporterfamilie (RhtB) in *C. glutamicum* hatte jedoch keinen Effekt auf den Export von KIC. Die heterologe Überexpression von *rhtC* in *C. glutamicum* führte allerdings zu einer leichten Erhöhung des KIC-Exports in *C. glutamicum*. Der Hauptanteil des KIC-Exports wird jedoch bereits vom in *C. glutamicum* vorhandenen KIC-Exporter übernommen.

9 Referenzen

Abe, S., Takayama, K., Kinoshita S., (1967), Taxonomical studies on glutamic acid producing bacteria. J. Gen. Microbiol. 13: 279-301.

Andrews S., Berks B., McClay J., Ambler A., Quail M., Golby P., Guest J., (1997), A 12-cistron *Escherichia coli* operon (hyf) encoding a putative proton-translocating formate hydrogenlyase system, Microbiology 143(Pt 11):3633-47

Atsumi S., Hanai T., Liao J., (2008), Non-fermentative pathways for synthesis of brached-chain higher alcohols as biofuels, Nature Letters 451:86-90

Avison MB., Horton RE., Walsh TR., Bennett PM., (2001), *Escherichia coli* CreBC is a global regulator of gene expression that responds to growth in minimal media, J Biol Chem. 276(29):26955-61

Ballan S., (2007), Diplomarbeit: Untersuchung zum Transport von Acetat und Pyruvat in *Corynebacterium glutamicum*, Institut für Biochemie, Universität zu Köln

Becker M., (2008), Diplomarbeit: Untersuchungen zum Kaliumtransport in *Corynebacterium glutamicum*, Institut für Biochemie, Universität zu Köln

Bellmann A., Vrljic M., Patek M., Sahm H., Krämer R., Eggeling L., (2001), Expression control and specificty of the basic amino acid exporter LysE of *Corynebacterium glutamicum*, Microbiology 147:1765-1774

Blattner FR., Plunkett G. 3rd, Bloch CA., Perna NT., Burland V., Riley M., Collado-Vides J., Glasner JD., Rode CK., Mayhew GF., Gregor J., Davis NW., Kirkpatrick HA., Goeden MA., Rose DJ., Mau B., Shao Y., (1997), The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12, Science 277(5331):1453-62

Blombach B., Schreiner M., Holátko J., Bartek T., Oldiges Mr., Eikmanns B., (2007), L-Valine Production with Pyruvate Dehydrogenase Complex-Deficient *Corynebacterium glutamicum*, American Society for Microbiology

Referenzen

Bochner B.R., Gadzinski P., Panomitros E., (2001), Phenotype MicroArrays for High-Throughput Phenotypic Testing and Assay of Gene Function, *Genome Res* 11:1246-1255

Boles E., Ebbighausen H., Eikmanns B., Krämer R., (1993), Unusual regulation of the uptake system for branched-chain amino acids in *Corynebacterium glutamicum*, *Arch Microbiol* 159:147–152

Boltres B., (2009), Doktorarbeit: Untersuchungen zum Export von Metaboliten und Xenobiotika in *Corynebacterium glutamicum*, Institut für Biochemie, Universität zu Köln

Brown K., Business Communication Company, (2005), Amino Acids: Highlighting Synthesis Applications, Online: <http://www.bccresearch.com/bio/BIO024B.asp> (21.05.07)

Brown K., (1970), Formation of Aromatic Amino Acid Pools in *Escherichia coli* K-12, *J Bacteriol.* 104(1):177-188

Bröer S., Krämer R., (1991), Lysine excretion by *Corynebacterium glutamicum*, Identification of a specific secretion carrier system, *Eur. J. Biochem* 202:131-135

Burkovski A., Weil B., Krämer R., (1996), Characterization of a secondary uptake system for L-glutamate in *Corynebacterium glutamicum*, *FEMS Microbiol Letters* 136:169-173

Burkovski A., Krämer R., (2002), Bacterial amino acid transport proteins: occurrence, functions and significance for biotechnological applications, *Appl Microbiol Biotechnol* 58:265-274

Chen CC., Fang M., Majumder A., Wu HY., (2001), A 72-base pair AT-rich DNA sequence element functions as a bacterial gene silencer, *J Biol Chem.* 276(12):9478-85
Cole S., Deeley R., (1993), Multidrug resistance-associated protein: sequence correction, *Science* 260:879

Referenzen

Cole S., Bhardwaj G, Gerlach J., Mackie J., Grant C., Almquist K., Stewart A., Kurz E., Duncan A., Deeley R., (1992), Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line, *Science* 258:1650-54

Coombes JS, McNaughton LR, (2000), Effects of branched-chain amino acid supplementation on serum creatine kinase and lactate dehydrogenase after prolonged exercise, *J SportsMed Phys Fitn* 40:240-246

Cruz-Ramos H., Cook G., Wu G., Cleeter M., Poole R., (2004), Membrane topology and mutational analysis of *Escherichia coli* CydDC, an ABC-type cysteine exporter required for cytochrome assembly, *Microbiology* 150:3415-3427

Dame RT., Wyman C., Goosen N., (2000), H-NS mediated compaction of DNA visualized by atomic force microscopy, *Nucleic Acids Res.* 28(18):3540-10

Diesveld R., Tietze N., Fürst O., Reth A., Bathe B., Sahm H., Eggeling L., (2009), Activity of Exporters of *Escherichia coli* in *Corynebacterium glutamicum*, and Their Use to Increase L -Threonine Production, *J Mol Microbiol Biotechnol* 16:198–207

Driessen J.M., de Jong S., Konings W.N., (1987), Transport of branched-chain amino acids in membrane vesicles of *Streptococcus cremoris*, *J Bacteriol* 169:5193-5200

Ebbighausen H., Weil B., Krämer R., (1989), Transport of branched-chain amino acids in *Corynebacterium glutamicum*, *Arch Microbiol* 151:238-244

Eggeling, I., Cordes C., Eggeling L., Sahm H., (1987), Regulation of acetohydroxy acid synthase in *Corynebacterium glutamicum* during fermentation of alfa-ketobutyrate to L-isoleucine, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 25:346–351.

Eikmanns B., Kleinertz E., Liebl W., Sahm, H., (1991), A family of *Corynebacterium glutamicum*/*Escherichia coli* shuttle vectors for cloning, controlled gene expression, and promoter probing. *Gene* 102: 93–98

Referenzen

Elišáková V., Pátek M., Holátko J., Nešvera J., Leyval D., Goergen J.L., Delaunay S., (2005), Feedback-Resistant Acetohydroxy Acid Synthase Increases Valine Production in *Corynebacterium glutamicum*, Appl and Env Mibi 71(1):207-213

Follmann M., (2008), Doktorarbeit: Untersuchungen zum Einfluss von pH-Variation und erhöhter CO₂ Konzentration auf Stoffwechsel und Aminosäureproduktion mit *Corynebacterium glutamicum*, Institut für Biochemie, Universität zu Köln

Grant, S., Jessee J., Bloom F.R., Hanahan D., (1990), Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants, Proc. Natl. Acad., USA, 87:4645-4649.

Guardiola J., De Felice M., Klopotoski T., Iaccarino M., (1974), Mutations Affecting the Different Transport Systems for Isoleucine, Leucine, and Valine in *Escherichia coli* K-12, J Bacteriol 117(2):393-405

Hodorova I., Schmidtova K., Hajdukova M., Bobrov N., Rybarova S., (2004), Immunohistochemical detection of MRP1 protein in normal and hyperplastic human Thyroid gland, Bratisl Lek Listy 105(10-11):362-364

Hutson S., Harper A., (1981), Blood and tissue branched-chain amino and α -keto acid concentrations: effect of diet, starvation, and disease, The American Journal of Clinical Nutrition 34:173–183

Ivey D., Guffanti A., Zemsky J., Pinner E., Karpel R., Padan E., Schuldiner S., Krulwich T., (1993), Cloning and characterization of a putative Ca²⁺/H⁺ antiporter gene from *Escherichia coli* upon functional complementation of Na⁺/H⁺ antiporter-deficient strains by the overexpressed gene, J Biol Chem 268(15):11296-303

Jolkver E., (2008), Doktorarbeit: Identification and characterization of carboxylate transporters in *Corynebacterium glutamicum*, Institut für Biochemie, Universität zu Köln

Kalinowski, J., Bathe B., Bartels D., Bischoff N., Bott M., Burkovski A., Dusch N., Eggeling L., Eikmanns B.J., Gaigalat L., Goesmann A., Hartmann M., Huthmacher K., Krämer R., Linke B., McHardy A.C., Meyer F., Möckel B., Pfefferle W., Pühler A., Rey

Referenzen

- D.A., Rückert C., Rupp O., Sahm H., Wendisch V.F., Wiegräbe I., Tauch A., (2003), The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived aminoacids and vitamins, J. Biotechnol. 104(1-3):5-25.
- Kase, H. and Nakayama, K., (1972), Production of L-threonine by analog-resistant mutants, Agric. Biol. Chem. 36: 1611-1621.
- Keilhauer C., Eggeling L., Sahm H., (1993), Isoleucine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*: molecular analysis of the *ilvB-ilvN-ilvC* operon, J Bacteriol 175:5595-5603
- Kelle R., Hermann T., Bathe B., (2005) L-Lysine production. Handbook of *Corynebacterium glutamicum*. 1: 465- 488
- Kennerknecht N., Sahm H., Yen M.R., Patek M., Saier M.H., Eggeling L., (2002), Export of L-Isoleucine from *Corynebacterium glutamicum*: a Two-Gene-Encoded Member of a New Translocator Family, J Bacteriol 184(4):3947-3956
- Kinoshita S., Udaka S., Shimono M., (1957), Studies on the amino acid fermentation. Production of L-glutamic acid by various microorganisms, J Gen Appl Microbiol 3:193-205
- Kronemeyer W., Peekhaus N., Krämer R., Sahm H., Eggeling L., (1995), Structure of the *gluABCD* Cluster Encoding the Glutamate Uptake System of *Corynebacterium glutamicum*, J of Bacteriol 1152-1158
- Krüger D., (2002), Dissertation, Die Sialat-Pyruvat-Lyase aus *Clostridium perfringens* A99: Isolierung des rekombinanten Enzyms und Untersuchung zum Reaktionsmechanismus
- Kyhse-Andersen J., (1984), Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose, J. Biochem. Biophys. Methods 3: 203–209.

Referenzen

Lawther R.P., Calhoun D. H., Adams C. W., Hauser C. A., Gray J., Hatfield G.W., (1981) Molecular basis of valine resistance in *Escherichia coli* K-12, Proc. NatL Acad. Sci. USA 78(2): 922-925

Laemmli U. K., (1970), Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 5259: 680–685.

Leuchtenberger W., Huthmacher K., Drauz K., (2005), Biotechnological production of amino acids and derivatives: current status and prospect, Appl Microbiol Biotechnol 69(1):1-8

Leyval D., Uy D., Delaunay S., Goergen J.L., Engasser J.M., (2003), Chracterisation of the enzyme activities involved in the valine biosynthetic pathway in a valine-producing strain of *Corynebacterium glutamicum*, J Biotechnol 104:241-252

Marienhagen J., Kennerknecht N., Sahm H., Eggeling L., (2005), Functional Analysis of All Aminotransferase Proteins Inferred from the Genome Sequence of *Corynebacterium glutamicum*, J Bacteriol 187(22):7639-7646

Marin K., Krämer R., (2007), Amino Acid Transport Systems in Biotchnologically Relevant Bacteria, Microbiol Monogr (5) V.F. Wendisch: Amino Acid Biosynthesis 289-325

Marz U., Business Communication Company, (2005), World Markets for Fermentation Ingredients, Online: <http://www.bccresearch.com/fod/FOD020B.asp> (21.05.07)

Mohrbach T., (2006), Diplomarbeit: Untersuchungen zum Import und Export von Tryptophan in *Corynebacterium glutamicum*, Institut für Biochemie, Universität zu Köln

Morbach S., Junger C., Sahm H., Eggeling L., (2000), Attenuation control of *ilvBNC* in *Corynebacterium glutamicum*: evidence of leader peptide formation without the presence of a ribosome binding site, J. Biosci. Bioeng. 90:501–507

Referenzen

Muffler A., Fischer D., Altuvia S., Storz G., Hengge-Aronis R., (1996), The response regulator RssB controls stability of the sigma(S) subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli*, EMBO J. 15(6):1333-9

Mullis, K. B., Farone, F. A., Schar, S., Saiki, R., Horn, G., and Ehrlich, H. (1986) Specific amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51: 263-273.

Nakamura J., Hirano S., Ito H., Wachi M., (2007), Mutations of the *Corynebacterium glutamicum* NCgl1221 Gene, Encoding a Mechanosensitive Channel Homolog, Induce L-Glutamic Acid Production, Appl and Env Mibi 73(14):4491-4498

Neidhardt, F. C. 1996. Galactose metabolism, p. In F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, 2nd ed. ASM Press, Washington, D.C.

Nettekoven J., (2008), Doktorarbeit: Untersuchungen zum Einfluss von pH- und CO₂-Stress auf Physiologie und Threoninproduktion von *Escherichia coli*, Institut für Biochemie, Universität zu Köln

Novak M., (1995), Diplomarbeit: Konstruktion und Analyse von *Escherichia coli* Genbanken, Evonik Degussa GmbH

Park J.H., Lee K.H., Kim T.Y. Lee S.Y., (2007), Metabolic Engineering of *Escherichia coli* for the production of L-valine based on transcriptome analysis and in silico gene knockout simulation, PNAS(104) 19:7797-7802

Pátek M., (2007), Branched-Chain Amino Acid, p. 128-162, In: Wendisch V. (Editor), Steinbüchel A. (Series Editor), Amino Acid Biosynthesis- Pathways, Regulation and Metabolic Engineering, Microbiology Monographs, Springerverlag

Peters-Wendisch P.G., Schiel B., Wendisch V.F., Katsoulidis E., Möckel B., Sahm H., Eikmanns B.J., (2001), Pyruvate carboxylase is a major bottleneck for glutamate and

Referenzen

lysine production by *Corynebacterium glutamicum*, J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 3(2):295-300.

Renzette N., Gumlaw N., Sandler SJ., (2007), DinI and RecX modulate RecA-DNA structures in *Escherichia coli* K-12, Mol Microbiol 63(1):103-115

Salmon K. A., Yang C.-R., Hatfield G. W., (2006) Biosynthesis and Regulation of the Branched-Chain Amino Acids, Module 3.6.1.5, page 2-62

Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.

Stackebrandt E., Rainey F.A., and Ward-Rainey N.L., (1997), Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 47: 479-491.

Stappen R., Krämer R., (1994), Kinetic Mechanism of Phosphate/Fosphate and Phosphate/OH⁻ Antiports Catalyzed by Reconstituted Phosphate Carrier from Beef Heart Mitochondria, J Biol Chem 269(15):11240-11246

Tauch A., Hermann T., Burkovski A., Krämer R., Pühler A., Kalinowski J., (1998), Isoleucine uptake in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 is directed by the *brnQ* gene product, Arch Microbiol 169:303-312

Tauch A., Götter S., Pühler A., Kalinowski J., Thierbach G., (2002), The 27.8-kb R-plasmid pTET3 from *Corynebacterium glutamicum* encodes the aminoglycoside adenylyltransferase gene cassette *aadA9* and the regulated tetracycline efflux system Tet 33 flanked by active copies of the widespread insertion sequence IS6100. Plasmid 48: 117-129

Trötschel C., Kandirali S., Diaz-Achirica P., Meinhardt A., Morbach S., Krämer R., Burkovski A., (2003), GltS, the sodium-coupled L-glutamate uptake system of *Corynebacterium glutamicum*: identification of the corresponding gene and impact on L-glutamate production, Appl Microbiol Biotechnol 60:738-742

Referenzen

Trötschel C., (2005), Doktorarbeit: Methioninaufnahme und -export in *Corynebacterium glutamicum*, Institut für Biochemie, Universität zu Köln

Umbarger, H. E. 1996. Biosynthesis of the branched-chain amino acids, p.442–457. In F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, 2nd ed. ASM Press, Washington, D.C.

Umez K., Nakayama K., Nakayama H., (1990), *Escherichia coli* RecQ protein is a DNA helicase, PNAS 87(14):5363-5367

Vrljic M., Eggeling L., Sahm H., (1996), A new type of transporter with a new type of cellular function: L-lysine export from *Corynebacterium glutamicum*, Mol Microbiol 22:815-826

Walser M., (1990), Role of branched-chain ketoacids in protein metabolism, Kidney International 38:595–604

Wang, Q., and J. M. Calvo, (1993), Lrp, a global regulatory protein of *Escherichia coli*, binds co-operatively to multiple sites and activates transcription of *ilvIH*, J. Mol. Biol. 229:306–318.

Wessler SR., Calvo JM., (1981), Control of leu Operon in expression in *Escherichia coli* by a transcription attenuation mechanism, J Mol Biol 149:579-597

Zakataeva N., Aleshin V., Tokmakova I., Troshin P., Livshits V., (1999), The novel transmembrane *Escherichia coli* proteins involved in the amino acid efflux. FEBS Lett. 452(3):228-32

Zittrich, S., and R. Krämer, (1994) Quantitative discrimination of carriermediated excretion of isoleucine from uptake and diffusion in *Corynebacterium glutamicum*. J. Bacteriol. 176:6892–6899

Weblinks

Web 1: www.sportmedinfo.de/BCAA.html

04.02.2010

Web 2: biocyc.org/ECOLI/NEW-IMAGE?type=PATHWAY&object=LEUSYN-PWY

04.02.2010

Web 3: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>

18.01.2010

Web 4: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/es/cgi-bin/jobresults.cgi/needle/needle-20100130-1109362221.html>

20.01.2010

Web 5: biocyc.org/ECOLI/NEW-IMAGE?type=ENZYME&object=RHTC-MONOMER

04.02.2010

Danksagung

Für die Bereitstellung des interessanten Promotionsthemas und für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. R. Krämer bedanken.

Ein weiterer Dank geht an Frau Prof. Dr. K. Schnetz für die Übernahme des Koreferats.

Ich möchte mich bei Dr. Kay Marin dafür bedanken, dass er stets mit einer ansteckenden Begeisterung an neue Projekte herangeht und ein steter Quell an neuen Ideen ist.

Ein besonderes Dankeschön geht an die guten Feen des Labors Ute, Eva, Gabi und Anja für ihre allgegenwärtige Hilfsbereitschaft bei den alltäglichen Problemen einer Doktorarbeit.

Bei meinen Kollegen bedanke ich mich für 3 interessante, lustige und ereignisreiche Jahre in Köln. Bei Bettine vor allem für die gemeinsame Zeit an der HPLC und bei Jens für die gemeinsamen Kaffee- und Mittagspausen.

Meinen Eltern danke ich für die allgegenwärtige Unterstützung ob aus der Nähe oder aus der Ferne.

Meinem Ehemann Daniel danke ich dafür, dass er in guten und in schlechten Zeiten immer da ist.

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. R. Krämer am Institut für Biochemie der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln betreut worden. Ich versichere, dass ich alle Angaben wahrheitsgemäß nach bestem Wissen und Gewissen gemacht habe und verpflichte mich, jede, die obigen Angaben betreffende Veränderung, dem Dekanat unverzüglich mitzuteilen.

Es liegen keine Teilpublikationen vor.

Datum: Köln, Juli, 2010

Unterschrift:

Lebenslauf

Name : Radespiel
Vorname : Tina
Geburtsname : Zeller
Geburtsdatum : 13.06.1980
Geburtsort : Sindelfingen
Familienstand : verheiratet
Nationalität : deutsch
Anschrift : Am Steinberg 43, 52353 Düren

1986-1990 : Grundschule Simmozheim

1990-1999 : Johannes-Kepler Gymnasium, Weil der Stadt
Abschluss: Abitur

1999-2004 : Studium des Chemieingenieurwesen
Fachhochschule Aachen, Abteilung Jülich
Abschluss: Diplom

10/2004-09/2006 : Studium der „Molecular Biotechnology“
Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
Abschluss: Master of Science

02/2007-04/2010 : Promotion
Institut für Biochemie
Arbeitsgruppe: Prof. Dr. R. Krämer
Universität zu Köln